



universität  
wien

# DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

„Untersuchungen zu Außenmembranproteinen von  
Umweltchlamydien“

Verfasser

Thomas Schott

angestrebter akademischer Grad

Magister der Naturwissenschaften (Mag.rer.nat.)

Wien, 2012

Studienkennzahl lt. Studienblatt:

A441

Studienrichtung lt. Studienblatt:

Diplomstudium Genetik - Mikrobiologie

Betreuer:

Univ.-Prof. Dr. Matthias Horn



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1	Die Ordnung <i>Chlamydiales</i> .....	1
1.1.1	Der chlamydiale Entwicklungszyklus.....	2
1.1.2	Symbiose zwischen Umweltchlamydien und frei lebenden Amöben.....	3
1.1.3	<i>Simkania negevensis</i> .....	3
1.1.4	<i>Parachlamydia acanthamoebae</i> UV7 .....	4
1.1.5	<i>Waddlia chondrophila</i> .....	4
1.2	Die äußere Membran von <i>Chlamydiales</i> .....	5
1.2.1	MOMP (“major outer membrane protein“) .....	6
1.2.2	OmcA und OmcB (“outer membrane complex A/B“).....	7
1.2.3	Pmps (“polymorphic membrane proteins“) .....	7
1.2.4	Unterschiede in der Zusammensetzung der Außenmembran von <i>Chlamydiaceae</i> und Umweltchlamydien .....	8
1.3	Ziele dieser Arbeit .....	10
<b>2</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>11</b>
2.1	Software .....	11
2.2	Technische Geräte .....	11
2.3	Verbrauchsmaterial .....	12
2.4	Kits .....	13
2.5	Chemikalien und Enzyme .....	13
2.6	Organismen .....	15
2.7	Primer, Sonden und Antikörper .....	15
2.8	Generelle Medien und Puffer .....	17
2.8.1	Medien und Puffer zur Amöbenanzucht .....	17
2.8.2	Puffer.....	17
2.8.3	Puffer, Lösungen und Standards für Agarose-Gelelektrophorese .....	18
2.8.4	Puffer und Lösungen für die Fluoreszenz <i>in situ</i> -Hybridisierung .....	19
2.8.5	Puffer und Lösungen für die Zellfixierung für Transmissionselektronenmikroskopie.....	20
2.8.6	Puffer und Lösungen für die Immunfluoreszenzanalyse .....	20
2.8.7	Puffer und Lösungen für die Westernblotanalyse.....	21
2.8.8	Puffer und Lösungen für die Extraktionen von Außenmembranproteinen..	22
2.8.9	Puffer, Lösungen und Standards für Natriumdodecylsulfat- Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	23
2.9	Kultivierung und Stammhaltung von <i>Acanthamoeba</i> sp. UWC1 .....	24
2.10	Hochaufreinigung von <i>S. negevensis</i> , <i>P. acanthamoebae</i> und <i>W. chondrophila</i> EBs.....	25
2.11	Partielle Aufreinigung von EBs.....	26
2.12	Generelle Methoden für das Screening von EBs.....	27
2.12.1	DNS-Isolierung aus hochaufgereinigten EBs .....	27
2.12.2	Vervielfältigung von DNS mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	27
2.12.3	Qualitative DNS-Analyse mittels Agarose-Gelelektrophore.....	28
2.12.3.1	Analyse der PCR-Produkte.....	28
2.12.3.2	Restriktionsverdau der amplifizierten 16S rRNS-Gene .....	29
2.12.4	Aufreinigung von PCR-Produkten.....	29
2.12.5	Quantitative, photometrische DNS-Analyse.....	29
2.12.6	Sequenzierung der PCR-Produkte .....	29

2.12.7	Fluoreszenz <i>in situ</i> -Hybridisierung (FISH) .....	30
2.12.7.1	Fixierung von Amöbenzellen mit 4 % PFA auf Teflon-Objektträgern .....	30
2.12.7.2	<i>In situ</i> -Hybridisierung .....	30
2.12.7.3	Auswertung mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie .....	31
2.12.8	DAPI- und DIOC <sub>6</sub> -Färbung der hochaufgereinigten EBs .....	31
2.12.8.1	Fixierung der EBs auf Teflon-Objektträgern .....	31
2.12.8.2	Färbung der EBs mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) .....	31
2.12.8.3	Färbung der EBs mit 3,3'-Dihexyloxacarbocyaniniodid (DIOC <sub>6</sub> ) .....	31
2.12.8.4	Auswertung mittels Epifluoreszenzmikroskopie .....	32
2.12.9	Zellfixierung für Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) .....	32
2.12.9.1	Zellfixierung für TEM 1 .....	32
2.12.9.2	Zellfixierung für TEM 2 .....	33
2.13	Antikörperproduktion: Immunfluoreszenz- und Westernblotanalyse .....	33
2.13.1	Produktion von Antikörpern gegen EBs .....	33
2.13.2	Auszählung der hochaufgereinigten EBs mittels DAPI- und DIOC <sub>6</sub> - Färbung auf einem Filter .....	33
2.13.3	Behandlung der Antikörper mit Amöbenlysate .....	34
2.13.4	Zellfixierung von Amöben für die Immunfluoreszenzanalyse .....	35
2.13.5	Immunfluoreszenzanalyse .....	35
2.13.6	Westernblotanalyse .....	36
2.14	Extraktion von Außenmembranproteinen aus hochaufgereinigten EBs mit verschiedenen Detergentien .....	37
2.14.1	Extraktion von Außenmembranproteinen mit Sarkosyl .....	37
2.14.2	Extraktion der Außenmembranproteinen mit n-octyl Polyoxyethylen .....	38
2.14.3	Extraktion von Außenmembranproteinen mit Triton X-114 .....	39
2.15	Analyse von Proteinen durch SDS-PAGE .....	39
2.16	Identifikation von Proteinen durch Massenspektrometrie .....	40
2.16.1	Probenvorbereitung für die Massenspektrometrie .....	40
2.16.2	Identifizierung der Proteine durch Massenspektrometrie .....	42
2.16.3	Analyse der identifizierten <i>S. negevensis</i> -Proteine mittels bioinformatischer Programme .....	42
2.17	Stabilitätsexperiment mit <i>Simkania negevensis</i> .....	43
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>45</b>
3.1	Hochaufreinigung von EBs .....	45
3.1.1	Hochaufreinigung von <i>Simkania negevensis</i> EBs mittels verschiedener Dichtegradienten .....	45
3.1.2	Überprüfung der Hochaufreinigung von EBs durch Transmissionselektronenmikroskopie .....	47
3.1.3	Screening von hochaufgereinigten EBs .....	49
3.2	Antikörper gegen Außenmembranproteine von hochaufgereinigten EBs .....	50
3.2.1	Präimmunserentest .....	50
3.2.2	Immunfluoreszenzanalyse mit Antikörpern gegen Außenmembranproteine von hochaufgereinigten EBs .....	50
3.2.3	Test auf Kreuzreaktion der Antikörper .....	52
3.3	Außenmembranproteine von Umweltchlamydien EBs .....	54
3.3.1	Analyse der Extraktionsmethoden von Außenmembranproteinen mittels SDS-PAGE .....	54
3.3.1.1	Extraktion der Außenmembranproteine aus hochaufgereinigten EBs durch Sarkosyl .....	54

3.3.1.2	n-octyl Polyoxyethylen und Triton X als alternative Extraktions- methode der Außenmembranproteine aus Umweltchlamydien EBs ....	55
3.3.2	Westernblotanalyse mit Außenmembranproteinfraktionen von <i>S. negevensis</i> nach Extraktion mit Sarkosyl .....	57
3.3.3	Identifikation von Außenmembranproteinen von <i>S. negevensis</i> durch Massenspektrometrie .....	57
3.4	Stabilitätsverhalten von <i>Simkania negevensis</i> .....	68
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>71</b>
4.1	Die Außenmembran von <i>Chlamydiales</i> EBs .....	71
4.1.1	Vom Genom zum Proteom .....	71
4.1.2	Probleme in der Analyse von Außenmembranproteinen der Chlamydien EBs .....	74
4.1.2.1	Die Hochaufreinigung der EBs von <i>S. negevensis</i> , <i>W. chondrophila</i> und <i>P. acanthamoebae</i> .....	74
4.1.2.2	Extraktion von Außenmembranproteinen .....	76
4.1.2.3	In silico-Vorhersagen .....	77
4.1.3	Antikörper gegen Umweltchlamydien EBs .....	77
4.1.4	Die Stabilität der EBs von <i>S. negevensis</i> .....	78
4.1.5	Ausblick .....	80
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>81</b>
<b>6</b>	<b>Summary.....</b>	<b>83</b>
<b>7</b>	<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>85</b>
<b>8</b>	<b>Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>87</b>
<b>9</b>	<b>Liste der verwendeten Abkürzungen .....</b>	<b>89</b>
<b>10</b>	<b>Referenzen .....</b>	<b>92</b>
<b>11</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>100</b>
<b>12</b>	<b>Lebenslauf.....</b>	<b>102</b>

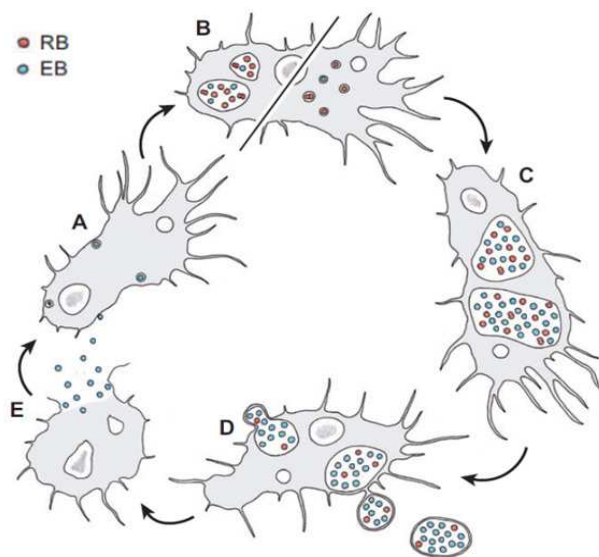




Geschlechtskrankheiten in den USA. Im Jahr 2009 waren dem CDC über 1,2 Millionen Fälle von *C. trachomatis*-Infektionen berichtet worden, wobei die Dunkelziffer weit höher liegt (CDC 2011).

### 1.1.1 Der chlamydiale Entwicklungszyklus

Trotz des unterschiedlichen Wirtsspektrums besitzen alle Arten der *Chlamydiales* einen einzigartigen Entwicklungszyklus. Dieser teilt sich in zwei Phasen auf, in denen die Chlamydien entweder als infektiöse, extrazelluläre Elementarkörperchen (EBs) oder als metabolisch aktive, intrazelluläre Retikularkörperchen (RB) vorliegen. Die EBs sind aufgrund der Zusammensetzung ihrer Zellwand stabiler und können daher extrazellulär bestehen (Hatch, Allan *et al.* 1984), sind aber metabolisch weniger aktiv als die RBs (Haider, Wagner *et al.* 2010). In Abbildung 2 ist ein beispielhafter Entwicklungszyklus von Umweltchlamydien in frei lebenden Amöben gezeigt.



**Abb. 2: Der zweistufige Entwicklungszyklus von Chlamydien in Amöben.** Abgeänderte Version von Horn 2008. Elementarkörperchen sind in blau und Retikularkörperchen in rot gezeigt.

Die EBs werden von der Wirtszelle durch Phagozytose aufgenommen (Abb. 2, A) und differenzieren sich nach der Aufnahme zu RBs (Abb. 2, B). Diese Differenzierung geschieht in kleineren und größeren Einschlüssen in der Wirtszelle. Durch binäre Zellteilung vermehren sich die RBs (Abb. 2, C) und differenzieren sich nach mehreren Zellteilungen wieder zu EBs zurück (Abdelrahman und Belland 2005). Die EBs verlassen letztendlich die Wirtszelle entweder durch Exozytose (Abb. 2, D) oder Lyse der



Wirtszelle (Abb. 2, E) und infizieren wiederum neue Wirtszellen (Hybiske und Stephens 2007).

### 1.1.2 *Symbiose zwischen Umweltchlamydien und frei lebenden Amöben*

Frei lebende Amöben sind weitverbreitete Protozoen, die hauptsächlich in Böden vorkommen, aber auch aus vielen anderen Habitaten isoliert werden konnten (Rodriguez-Zaragoza 1994). Amöben ernähren sich unter anderem von Bakterien und regulieren dadurch bakterielle Populationen (Rodriguez-Zaragoza 1994). Einige dieser Bakterien können jedoch die Aufnahme in Amöben überleben und sich in diesen vermehren (Schmitz-Esser, Toenshoff *et al.* 2008). Zu diesen Bakterien gehören auch die drei Umweltchlamydien, mit denen in dieser Studie gearbeitet wurde und in folgenden Punkten näher beschrieben werden. Diese wurden in axenischen fortlaufenden Kulturen in *Acanthamoeba* sp. UWC1 gehalten. Fritsche *et al.* konnte in Studien zeigen, dass 25% aller *Acanthamoeba*-Isolate bakterielle Symbionten enthalten und 5% dieser Bakterien Umweltchlamydien sind (Fritsche, Gautom *et al.* 1993; Fritsche, Horn *et al.* 2000).

### 1.1.3 *Simkania negevensis*

*Simkania negevensis*, ein Mitglied der Familie der *Simkaniaceae* (Abb. 1, lila Stern), wurde ursprünglich als Kontamination in Vero Zellen entdeckt (Kahane, Gonen *et al.* 1993).

*Simkania negevensis* infiziert neben Amöben (Abb. 3) auch Makrophagen und Epithelzellen des Atem- und Genitaltrakts (Kahane, Fruchter *et al.* 2007) und wurde in Personen mit Atemwegserkrankungen detektiert, wobei *S. negevensis* nicht als Auslöser der Erkrankungen verifiziert werden konnte (Friedman, Kahane *et al.* 2006; Kumar, Kohlhoff *et al.* 2005).

*S. negevensis* unterscheidet sich von den *Chlamydiaceae* durch einen längeren Entwicklungszyklus in Vero Zellen, von mehr als sieben Tagen gegenüber zwei bis drei

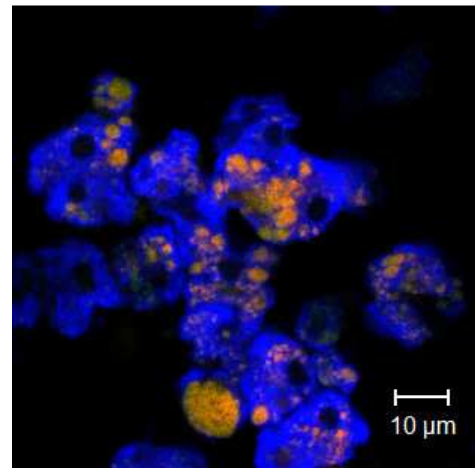


Abb. 3: Fluoreszenz *in situ*-Hybridisierung von *Acanthamoeba* sp. UWC1 (in blau) infiziert mit *Simkania negevensis* (in orange).

Tagen (Kahane, Kimmel *et al.* 2002). Verglichen mit dem Genom von *Chlamydiaceae* (1 Mb) ist das Genom von *S. negevensis* zweieinhalbmal (2,5 Mb) größer (Collingro, Tischler *et al.* 2011). Darüber hinaus besitzt *S. negevensis* ein konjugatives Plasmid, das eine Größe von 132 Kilo-Basenpaaren aufweist (Collingro, Tischler *et al.* 2011).

### 1.1.4 *Parachlamydia acanthamoebae* UV7

*Parachlamydia acanthamoebae* wurde erstmals in Amöben detektiert, die man aus der Nasenschleimhaut eines Menschen isoliert hatte (Amann, Springer *et al.* 1997).

Ähnlich wie *Simkania negevensis* können auch *Parachlamydia acanthamoebae*, die zu den *Parachlamydiaceae* gehören (Abb. 1, grüner Stern), humane Zelllinien infizieren und darin proliferieren (Greub, Mege *et al.* 2003). Auch *P. acanthamoebae* wurde mit Atemwegserkrankungen in Verbindung gebracht (Corsaro, Venditti *et al.* 2002; Greub, Boyadjiev *et al.* 2003). Mit drei Megabasen ist das Genom von *P. acanthamoebae* dreimal so groß, wie das der *Chlamydiaceae* (Collingro, Tischler *et al.* 2011).

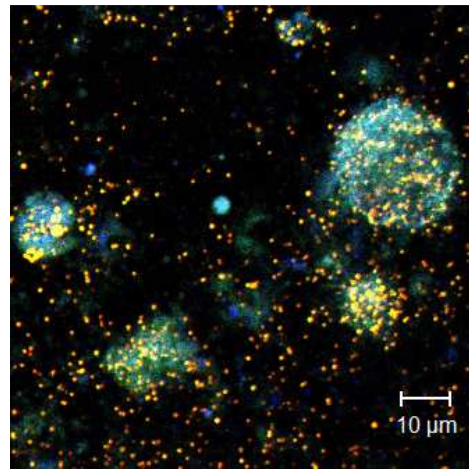


Abb. 4: Fluoreszenz *in situ*-Hybridisierung von *Acanthamoeba* sp. UWC1 (in blau) infiziert mit *Parachlamydia acanthamoebae* (in orange).

Kürzlich wurde in einer Studie von Sixt *et al.* herausgefunden, dass *Parachlamydia acanthamoebae* in Insektenzellen Apoptose auslöst, während sich *Simkania negevensis* in diesen effizient repliziert (Sixt, Hiess *et al.* 2012). In den Aufnahmen der Fluoreszenz in situ Hybridisierungen (Abb. 3 und 4) kann man einen weiteren Unterschied erkennen, da die Amöben nach sieben Tagen, nachdem sie gefüttert wurden, bei *P. acanthamoebae* (Abb. 4) weitestgehend lysiert waren, hingegen bei *S. negevensis* (Abb. 3) nicht.

### 1.1.5 *Waddlia chondrophila*

*Waddlia chondrophila* wurde unabhängig voneinander in Rinderfehlgeburten in den USA (Dilbeck, Evermann *et al.* 1990) und in Deutschland (Henning, Schares *et al.* 2002) entdeckt. In weiteren Studien wurde *Waddlia chondrophila* auch mit Fehlgeburten bei Menschen in Verbindung gebracht (Baud, Regan *et al.* 2008).

*W. chondrophila* (Abb. 1, blauer Stern) gehört zur Ordnung der *Chlamydiales* und bildet dort die Familie der *Waddliaceae*. *Waddlia chondrophila* können ebenso wie *S. negevensis* und *P. acanthamoeba* in *Acanthamoeba* sp. UWC1 kultiviert werden (Abb. 3-5). Im Genom von *Waddlia chondrophila* (2,14 Mb) wurden viele wichtige Genabschnitte für komplette Stoffwechselwege und komplette Sekretionssysteme gefunden (Collingro, Tischler *et al.* 2011).

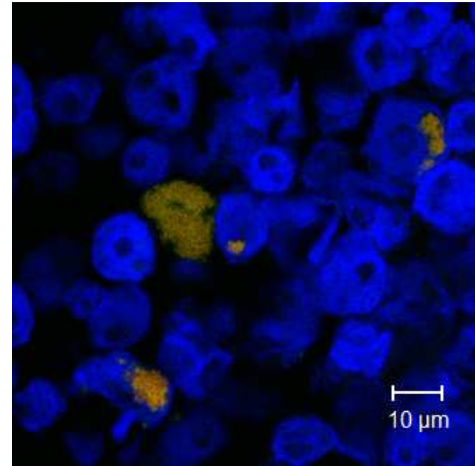


Abb. 5: Fluoreszenz *in situ*-Hybridisierung von *Acanthamoeba* sp. UWC1 (in blau) infiziert mit *Waddlia chondrophila* (in orange).

Letztlich sei zu erwähnen, dass bis dato eine Pathogenität von den drei genannten Umweltchlamydien auf den Menschen nur vermutet wurde, da es keine umfassenden klinischen Studien gibt (Siegl und Horn 2011).

## 1.2 Die äußere Membran von *Chlamydiales*

Die Außenmembranproteine der Chlamydien spielen neben der Stabilisierung der Zelle vor allem bei der Anheftung an die Wirtszellen, der Aufnahme von Nährstoffen und der Differenzierung von EBs zu RBs eine wichtige Rolle. Die Zellwand der Chlamydien, bestehend aus einer inneren und einer äußeren Membran, ist vergleichbar mit der von Gram-negativen Bakterien. Es besteht jedoch seit geraumer Zeit eine langanhaltende Debatte darüber, ob *Chlamydiae* in ihrer Zellwand Peptidoglykan besitzen oder nicht (Martin und Pavelka 2007). Während neuere Studien tatsächlich bewiesen, dass viele Gene für die Biosynthese des Peptidoglykans in den Genomen von *Chlamydiaceae* vorhanden sind (McCoy und Maurelli 2006; Stephens, Kalman *et al.* 1998), fehlen jedoch wichtige Enzyme für eine komplette Synthese. Hier nimmt man an, dass *Chlamydiaceae* anstelle des Peptidoglykans in der Membran die cysteinreichen Proteine OmcA und OmcB (‘‘outer membrane complex‘’) besitzen, die durch Disulfidbindungen einen Komplex in der äußeren Membran bilden, der für die Stabilität der EBs verantwortlich ist (Hatch 1996).

Neben den cysteinreichen Proteinen existieren in der äußeren Membran von *Chlamydiaceae* sogenannte “polymorphic membrane proteins“ (Pmps) (Grimwood und Stephens 1999) und das am häufigsten vorkommende Protein, das “Major outer membrane protein“ (MOMP) (Abb. 6) (Caldwell, Kromhout *et al.* 1981; Caldwell, Kromhout *et al.* 1981; Hatch, Vance *et al.* 1981). Diese Proteine sind die Hauptbestandteile des “chlamydial outer membrane complex“ (COMC) und werden nun im Folgenden näher beschrieben.

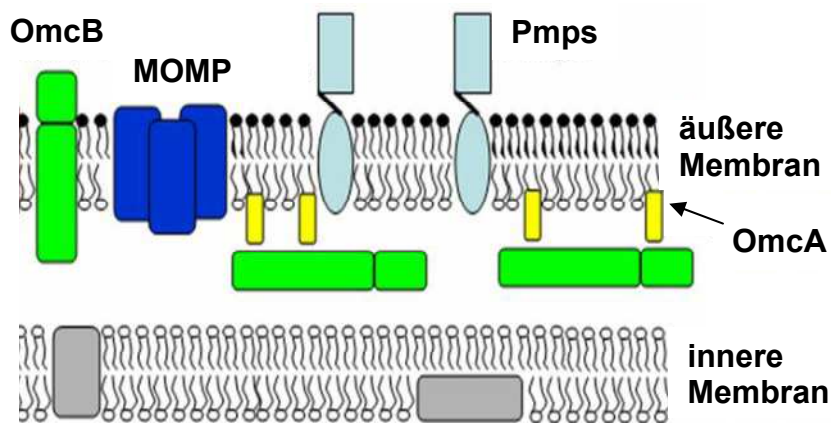


Abb. 6: Modell der inneren und äußeren Membran von *Chlamydiaceae*. Abgeänderte Version von Heinz 2008.

### 1.2.1 MOMP (“major outer membrane protein“)

Einer Studie von 1981 zufolge macht das “Major outer membrane protein“ (MOMP) 60% der Proteine des COMC von *Chlamydiaceae* aus (Caldwell, Kromhout *et al.* 1981). Drei Jahre später konnte Bavoil *et al.* mittels eines Experiments - in dem das Quellverhalten künstlicher Liposomen mit inserierten MOMPs untersucht wurde - zeigen, dass es sich bei MOMP um ein Porin handelt (Bavoil, Ohlin *et al.* 1984). Porine sind wassergefüllte Kanäle, die es kleinen Molekülen erlauben durch die Außenmembranen zu diffundieren (Cowan, Schirmer *et al.* 1992; Zeth und Thein 2010). Die Besonderheit des chlamydialen MOMP besteht darin, dass es nicht nur als Porin fungiert, sondern auch bei der Infektion für die Anheftung an die Wirtszelle wichtig ist (Su, Watkins *et al.* 1990) und für die Stabilität der EBs sorgt (Hackstadt, Todd *et al.* 1985). Das MOMP ist 40 kDa groß und besteht aus mehreren “ $\beta$ -sheets“, die für Porine typisch sind (Wyllie, Ashley *et al.* 1998).

### 1.2.2 OmcA und OmcB (“outer membrane complex A/B“)

Bei den *Chlamydiaceae* sind neben MOMP die beiden cysteinreichen Proteine OmcA und OmcB Hauptbestandteile der Außenmembran. Diese Proteine bilden durch Disulfidbrückenbindungen den COMC und sorgen so für die Stabilität der Zellwand der EBs (Hatch 1996). Das kleinere cysteinreiche Protein OmcA (12 kDa) ist ein Lipoprotein (Hatch 1996). Das größere cysteinreiche Protein OmcB (40 kDa) ist zudem wichtig bei der Anheftung und dem Eintritt in die Wirtszelle (Moelleken und Hegemann 2008). Im zweistufigen Entwicklungszyklus werden die Disulfidbrücken der cysteinreichen Proteine nach Eintritt in die Wirtszelle reduziert, wodurch EBs zu RBs differenzieren (Hatch, Allan *et al.* 1984).

Bei *C. pneumoniae* beispielsweise macht der prozentuale Cysteingehalt für OmcA 16,6% und für OmcB 6,1% aus (Watson, Clarke *et al.* 1995), während der durchschnittliche Gehalt der Cysteine im Protein nur 1,6% beträgt. In anderen Prokaryoten wie *Cyanobacteria*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, und *R. sphaeroides* wurden in den Proteindurchsuchungen nur 1 bis 1,1% Cysteine detektiert (Miseta und Csutora 2000).

### 1.2.3 Pmps (“polymorphic membrane proteins“)

Die Polymorphen Membranproteine (Pmps) der *Chlamydiaceae* gehören zur Familie der Autotransporter (Henderson und Lam 2001), die C-terminale Autotransporterdomänen und die zwei typischen, sich wiederholenden Sequenzmotive besitzen. Autotransporter sind Proteine, die meist als Adhesine oder Virulenzfaktoren fungieren und ihren eigenen Transport zur äußeren Membran bewerkstelligen, in der sie in der Außenmembran eingebaut werden (Henderson, Navarro-Garcia *et al.* 2004). Die Funktion der meisten Pmps von *Chlamydiaceae* ist noch ungeklärt, nur von einigen Pmps weiß man, dass sie bei der Anheftung an die Wirtszellen von Bedeutung sind (Mölleken, Schmidt *et al.* 2011; Wehrl, Brinkmann *et al.* 2004). In *C. trachomatis* beispielsweise wurden die Pmps unterschiedlicher Serotypen mit spezifischen Gewebserkrankungen in Verbindung gebracht (Gomes, Nunes *et al.* 2006; Stothard, Toth *et al.* 2003).

#### 1.2.4 Unterschiede in der Zusammensetzung der Außenmembran von *Chlamydiaceae* und Umweltchlamydien

Die meisten Studien über Außenmembranproteine von *Chlamydiales* wurden bisher über die der *Chlamydiaceae* gemacht, da diese wichtige bakterielle Pathogene für Menschen darstellen. Ein besseres Verständnis über die Zusammensetzung der Außenmembran, so erhofft man sich, könnte zu einem geeigneten Impfstoff gegen Infektionen mit Chlamydien führen. Bis dato gibt es einige Studien über die Zusammensetzung der äußeren Membran von *Chlamydiaceae*, sodass bereits genannte Hauptbestandteile der Außenmembran und andere Proteine wie das Porin PorB (Kubo und Stephens 2000) oder das Außenmembranprotein OprB (Birkelund, Morgan-Fisher *et al.* 2009) beschrieben werden konnten. Liu *et al.* untersuchte zuletzt die Außenmembran von *C. trachomatis* mittels massenspektrometrischer Analyse und konnte unter anderem zuvor genannte Proteine identifizieren (Liu, Afrane *et al.* 2010).

Im Gegensatz dazu sind Studien über Außenmembranproteine von Umweltchlamydien rar, da diese einerseits erst vor Kurzem entdeckt wurden und andererseits eine mögliche Pathogenität für Menschen umstritten ist. Erste umfangreiche Untersuchungen zu Außenmembranproteinen von *P. amoebophila* wurden durch Heinz *et al.* unternommen, die teilweise Gemeinsamkeiten in der Zusammensetzung der äußeren Membran zu *Chlamydiaceae* zeigte (Heinz, Pichler *et al.* 2010; Heinz, Tischler *et al.* 2009). Durch die Sequenzierung der Genome von *S. negevensis*, *W. chondrophila* und *P. acanthamoebae* konnten weitere Vergleiche mit *Chlamydiaceae* gemacht werden, die sich unter anderem auch auf Außenmembranproteine bezogen (Bertelli, Collyn *et al.* 2010; Collingro, Tischler *et al.* 2011; Heinz, Myers *et al.* 2008; Heinz, Pichler *et al.* 2010). Bei *Waddlia chondrophila* wurde eine neue OMP Familie gefunden, die elf Proteine mit einer Ähnlichkeit zu MOMP der *Chlamydiaceae* beinhaltet (Bertelli, Collyn *et al.* 2010). *In silico*-Vorhersagen und proteomische Analysen der Außenmembran von *Protochlamydia amoebophila* EBs wiederum zeigten, dass zwar mehrere Homologe zu Außenmembranproteinen von *Chlamydiaceae* wie OmcA und OmcB identifiziert wurden, aber das Porin MOMP, eines der Hauptkomponenten der Außenmembran der pathogenen Chlamydien, nicht gefunden werden konnte (Heinz, Pichler *et al.* 2010; Heinz, Tischler *et al.* 2009).

In Tabelle 1 ist ein Auszug der Ergebnisse des Vergleichs der Außenmembran von Chlamydien von Collingro und Tischler *et al.* 2011 gezeigt. Bei *Simkania negevensis*

## Einleitung

wurden im Genom zwei Homologe von MOMP gefunden und 35 MOMP-ähnliche Proteine. Hingegen sind bei *Protochlamydia* und *Parachlamydia* im Genom keine Homologe von MOMP identifiziert worden (Collingro, Tischler *et al.* 2011). Die cysteinreichen Proteine OmcA und OmcB konnte man nicht in *Simkania* finden, während man wie oben erwähnt bei *P. amoebophila* beide cysteinreichen Proteine sowohl *in silico* als auch experimentell gefunden hat (Heinz, Pichler *et al.* 2010; Horn, Collingro *et al.* 2004). Bei *Parachlamydia* und *Waddlia* wurde von den beiden cysteinreichen Proteinen nur OmcB identifiziert. Polymorphe Membranproteine konnten lediglich bei *Simkania* gefunden werden. Hier wurden drei Homologe von PmpB ausfindig gemacht, die allerdings geringe Sequenzidentitäten aufweisen, wobei die Sequenzidentitäten von Pmps zwischen unterschiedlichen Serotypen innerhalb einer Spezies von *Chlamydiaceae* ohnehin niedrig sind (Gomes, Nunes *et al.* 2006; Stothard, Toth *et al.* 2003).

**Tab. 1: Vergleich von *in silico* ermittelten „Außenmembran“-Genen in den Genomen von *Simkania negevensis* (Sn), *Waddlia chondrophila* (Wc), *Parachlamydia acanthamoebae* UV7 (Pa), *Protochlamydia amoebophila* UWE25 (Pam) und *Chlamydiaceae* (C). Grün bedeutet „Gen anwesend“ und rot bedeutet „Gen abwesend“; Tabelle entnommen von Collingro, Tischler *et al.* 2011.**

Genname	Beschreibung	Sn	Wc	Pa	Pam	C
MOMP	“Major outer membrane protein“ (1.2.1)	2x <sup>1)</sup>				
omcB	“outer membrane complex B“ (1.2.2)					
omcA	“outer membrane complex A“ (1.2.2)					
porB	Porin - PorB					
oprB	“outer membrane protein B“					
PAL	Peptidoglykan-assoziiertes Lipoprotein					
yaeT	omp85 Familien-Membranprotein					
pmpA	“Polymorphic membrane protein“(1.2.3)					
pmpB		3x <sup>2)</sup>				
pmpC						
pmpD						
pmpE						
pmpF						
pmpG						
pmpH						
pmpI						

- 1) zwei Homologe von MOMP gefunden, die 26-28% Sequenzidentität mit *C. trachomatis*
- 2) drei Proteine zeigen 22-28% Sequenzidentität mit den entsprechenden *Chlamydiaceae* Pmps

Zusammenfassend zeigen diese genomischen Vergleiche, dass es erhebliche Unterschiede in der Zusammensetzung der Außenmembran von pathogenen Chlamydien und Umweltchlamydien gibt, welche die unterschiedlichen Wirtsspektren der Familien der *Chlamydiales* erklären könnten.



### 1.3 Ziele dieser Arbeit

Die Außenmembran von pathogenen Chlamydien ist ein wichtiger Bestandteil in der Erforschung von diesen obligat intrazellulären Bakterien, um geeignete Maßnahmen für die Bekämpfung dieser zu finden.

Da sich bislang die Forschung hauptsächlich mit den pathogenen Chlamydien hinsichtlich der Außenmembran beschäftigt hat, ist das Hauptziel dieser Arbeit die Untersuchung der Außenmembran von *Simkania negevensis*, einem Mitglied der Ordnung *Chlamydiales*. Hierfür wurde eine proteomische Analyse von extrahierten Außenmembranproteinen aus hochaufgereinigten *Simkania negevensis* EBs durchgeführt. Darüber hinaus wurde derselbe Ansatz für zwei weitere Umweltchlamydien - *Waddlia chondrophila* und *Parachlamydie acanthamoebae* UV7 - vollzogen, wobei hier bis dato noch keine Ergebnisse der massenspektrometrischen Analyse der Außenmembran vorlagen.

Des Weiteren wurden Antikörper gegen hochaufgereingte EBs der drei Umweltchlamydien durch eine Immunisierung von Hasen und Meerschweinchen hergestellt und mittels Immunfluoreszenz- und Westernblotanalysen getestet, um beispielsweise immunodominante Proteine zu identifizieren.

Letztlich wurden die ermittelten massenspektrometrischen Ergebnisse von *Simkania negevensis* mit den bereits bekannten *in silico*-Vorhersagen (Collingro, Tischler *et al.* 2011) verglichen.

Darüber hinaus wurde eine Hypothese hinsichtlich des Stabilitätsverhaltens von *Simkania negevensis* EBs durch ein abschließendes Experiment bestätigt.



## 2 Material und Methoden

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien sind charakterisiert durch – wenn nicht anders angegeben – eine *p.a.* Qualität. Alle Puffer, Medien und Lösungen wurden mit doppelt destilliertem und gefiltertem Wasser ( $\text{ddH}_2\text{O}$ ) (Water purification system MILLI-Q® biocel, Millipore GmbH, Wien, A) hergestellt. Die pH-Werte der Medien und Lösungen wurden mittels einer Natriumhydroxid- (NaOH) bzw. einer Salzsäureverdünnung (HCl) eingestellt.

### 2.1 Software

Tab. 2: Verwendete Software

Software	Hersteller
AxioVision 4	Geospiza, Seattle, WA, USA
Basic Local Alignment Tool (Blast)	National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD, USA
FinchTV 1.4	Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena, D
LSM Image Browser	Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena, D
Microsoft Office 2007	Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA

### 2.2 Technische Geräte

Tab. 3: Verwendete technische Geräte

Geräte	Hersteller
Agarose gelelektrophoresis apparatus Sub-Cell GT	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D
CCD camera AxioCam HRc	Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena, D
Concentrator 5301	Eppendorf AG, Hamburg, D
Dounce homogeniser	Wheaton, Milville, NJ, USA
Elektrophoresis power supply (PowerPac Basic)	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D
icycler Thermal cycler	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D
Laminar flow hood, model 1.8	Holten, Jouan Nordic, Allerød, DK
Magnetischer Rührer RCT basic	IKA® Werke GmbH & Co.KG, Staufen, D
Mikrobiologischer Inkubator KB 115	Binder GmbH, Tuttlingen, D
Mikroskope: Inverses Mikroskop Axiovert 25 Epifluoreszenzmikroskop Axioplan 2 imaging Konfokales Laser-Scanning-Mikroskop LSM 510 Meta	Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena, D Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena, D Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena, D
Mini-PROTEAN Casting Stand	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D
Mini-PROTEAN Tetra Cell	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D
Mixing Block MB-102	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, D

## Material und Methoden

NanoDrop® ND-1000 UV/Vis spectrophotometer	NanoDrop Technologies Inc., Wilmington, DE, USA
Neubauer Zählkammer	Paul Marienfeld GmbH & Co KG, Lauda-Königshofen, D
pH meter inoLab pH Level 1	Wissenschaftlich technische Werkstätten (WTW) GmbH & Co.KG, Weilheim, D
ScannerEpson Expression 1680 Pro	Epson Deutschland GmbH, Meerbusch, D
Trans-Blot® SD SEMI-DRY Transfer Cell	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D
Transilluminator	Biostep GmbH, Jahnsdorf, D
Ultrasonic Cleaner SC100T	VWR International bvba/sprl, Leuven, B
UV sterilizing PCR workstation	PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, D
Vortex-Genie 2	Scientific Industires Inc., Bohemia, NY, USA
Waagen: OHAUS® Analytical Plus balance Sartorius BL 3100	Ohaus Corporation, Pine Brook, NJ, USA Sartorius AG, Göttingen, D
Wasserbäder: DC10 GFL® type 1004	Thermo Haake GmbH, Karlsruhe, D Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgwedel, D
Water purification system MILLI-Q® biocel	Millipore GmbH, Wien, A
Wasserdampf-Hochdruckautoklaven: Varioclav® 135 S h+P Varioclav® 25 T H+P	H+P Labortechnik GmbH, Oberschleißheim, D H+P Labortechnik GmbH, Oberschleißheim, D
Zentrifugen: Centrifuge 5840 R Optima™ L-100 XP ultracentrifuge	Eppendorf AG, Hamburg, D Beckman Coulter, Inc., Palo Alto, CA, USA

## 2.3 Verbrauchsmaterial

**Tab. 4: Verwendetes Verbrauchsmaterial**

<b>Verbrauchsmaterial</b>	<b>Hersteller</b>
25 cm <sup>2</sup> Tissue culture flasks	Asahi Techno Glass Corporation, Iwaki Glass Co.,Ltd., Funabashi-City, J
500 cm <sup>2</sup> Tissue culture flasks	Nunc, Roskilde, DK
Cellulose-Acetate-Membranfilter (0.45 µm pore size, 25 mm diameter)	Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen, D
Deckgläschen 24 x 60 mm	Paul Marienfeld GmbH & Co.KG, Lauda-Königshofen, D
Einweg-Injektions-Kanülen Sterican® (ø 0,45 x 25 mm, ø 0,90 x 40 mm), steril	B.Braun Melsungen AG, Melsungen, D
Einwegspritzen (1 ml) Inject®, steril	B.Braun Melsungen AG, Melsungen, D
Einwegspritzen (5 ml) Omnifix®, steril	B.Braun Melsungen AG, Melsungen, D
Einwegspritzen-Filter, steril, 0.20 µm pore size	Asahi Techni Glass Corporation, Iwaki Glass Co.,Ltd., Funabashi-City, J
Einwegspritzen-Filter, steril, 1.20 µm pore size	Sartorius AG, Göttingen, D
Glass beads (0,75-1.0 mm)	Macherey-Nagel GmbH&Co.KG, Karlsruhe, D
Greiner-Röhrchen(15 ml, 50 ml)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, D
Isopore™ Polycarbonat-Membranfilter (Porengröße 0.22 µm, ø 25 mm, schwarz)	Millipore GmbH, Wien, A

Mikroskop-Objektträger (76 x 26 mm)	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, D
Mikroskop-Objektträger, 10 well	Paul Marienfeld GmbH & Co KG, Lauda-Königshofen, D
Mini-Protean TGX Precast Gel, 10%	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D
Multiwell dishes, polystyrene (24 wells)	Nunc, Roskilde, DK
Parafilm® M laboratory film	American National Can Company, Chicago, IL, USA
PCR Reaktionsgefäße (0.2 ml)	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, D
Pipettenspitzen (verschiedene Größen)	Carl Roth GmbH Co.KG, Karlsruhe, D
Plastikpipetten (10 ml, 2 ml), steril	Barloworld Scientific Ltd., Staffordshire, UK
Polyvinylidenfluorid-Membran (Hydrobond P)	GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, S
Reaktionsgefäße (1.5 ml)	GenXpress Service & Vertriebs GmbH, WienerNeudorf, A
Reaktionsgefäße (2 ml)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, D
Runde Deckgläschen (12 mm Durchmesser)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, D
Safeseal-Tips® Premium	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, D
Ultrazentrifugationsröhrchen	Beckham Coulter, Inc. Paolo Alto, CA, USA
Whatman® Chromatography Paper 3MM Chr	Whatman International Ltd., Maidstone, UK

## 2.4 Kits

Tab. 5: Verwendete Kits

Kit	Hersteller
Dneasy Blood & Tissue Kit	QIAgen, Hilden, D
QIAquick PCR Purification Kit	QIAgen, Hilden, D
Western Lightning® Chemiluminescence Reagent PlusKit	PerkinElmer Life Sciences, Waltham, MA, USA

## 2.5 Chemikalien und Enzyme

Tab. 6: Verwendete Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Laktan Chemikalien und Laborgeräte GmbH, Graz, A
3,3'-Dihexyloxacarbocyaniniodid (DIOC <sub>6</sub> )	Invitrogen Molecular Probes, Carlsbad, CA, USA
Acetonitril	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
LE Agarose	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, D
Ammoniumbicarbonat	Fluka Chemie AG, Buchs, CH
Ammoniumpersulfat (APS)	GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, S
Ampicillin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
Borsäure	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, D
Bovine serum albumin (BSA)	Carl Roth GmbH Co.KG, Karlsruhe, D
Brilliant Blue R-250	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, D

## Material und Methoden

Bromphenolblau	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
Calciumchlorid-Dihydrat	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, D
Citifluor AF1	Agar Scientific Ltd., Stansted, UK
cOmplete, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail	Roche Diagnostics GmbH, Wien, A
Coomassie brilliant blue G-250	Carl Roth GmbH Co.KG, Karlsruhe, D
Disodiumhydrogenphosphat-Dihydrat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ )	Carl Roth GmbH Co.KG, Karlsruhe, D
Dithiothreitol (DTT)	Fluka Chemie AG, Buchs, CH
Essigsäure	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, D
Ethanol absolut	AustrAlco Österreichische Alkoholhandels GmbH, Spillern, A
Ethidiumbromid (EtBr)	Fluka Chemie AG, Buchs, CH
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, D
Ferrous ammonium sulfate hexahydrate	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
Ficoll® 400	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
Formaldehyd (37% (w/w))	Carl Roth GmbH Co.KG, Karlsruhe, D
Gastrografin®	Schering Austria GmbH, Wien, A
Glucose	Carl Roth GmbH Co.KG, Karlsruhe, D
Glycerol (87% (w/v))	Carl Roth GmbH Co.KG, Karlsruhe, D
Glycin	Carl Roth GmbH Co.KG, Karlsruhe, D
Hefeextrakt	Oxoid Ltd., Hampshire, UK
HEPES	Carl Roth GmbH Co.KG, Karlsruhe, D
Iodacetamid	GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, S
Isopropanol	Carl Roth GmbH Co.KG, Karlsruhe, D
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	Merck GmbH, Wien, A
Methanol	Carl Roth GmbH Co.KG, Karlsruhe, D
Moviol 4-88	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
N,N,N',N'-Tetramethylethan-1,2-diamin (TEMED)	Fluka Chemie AG, Buchs, CH
N-Lauroylsarcosin (Sarkosyl)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH Co.KG, Karlsruhe, D
Natriumdihydrogenphosphat	Mallinckrodt Baker B.V., Deventer, NL
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth GmbH Co.KG, Karlsruhe, D
Natriumhydroxid (NaOH)	Carl Roth GmbH Co.KG, Karlsruhe, D
n-octyl Polyoxyethylen (n-octyl POE)	BACHEM BIOCHEMICA GmbH, Heidelberg, D
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
Ponceau S	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
Protease peptone	Oxoid Ltd., Hampshire, UK
Rotiphorese® NF-Acrylamide/ Bisacrylamide-solution 30 % (29:1)	Carl Roth GmbH Co.KG, Karlsruhe, D
Saccharose	Merck KGaA, Darmstadt, D
Salzsäure (HCl) (37% (w/w))	Carl Roth GmbH Co.KG, Karlsruhe, D
Trifluoressigsäure	Fluka Chemie AG, Buchs, CH
Trishydroxymethylaminomethan (Tris-HCl)	Carl Roth GmbH Co.KG, Karlsruhe, D
Triton™ X-114	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
Trypticase Soy Broth	Oxoid Ltd., Hampshire, UK
Trypsin Gold	Promega Corporation, Madison, USA
Tween™ 20	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
Xylencyanol FF	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D

**Tab. 7: Verwendete Enzyme und Enzympuffer**

Enzyme	Hersteller
Benzonase® Nuclease	Novagen, Darmstadt, D
Buffer O	Fermentas Inc., Hanover, MD, USA
Lysozyme human ( $\geq 100$ U/ $\mu$ g)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
Taq DNS Polymerase (5U/ $\mu$ l)	Fermentas Inc. Hanover, MD, USA
10 x Taq buffer	Fermentas Inc. Hanover, MD, USA
VspI (10 U/ $\mu$ l)	Fermentas Inc., Hanover, MD, USA

## 2.6 Organismen

**Tab. 8: Verwendete Organismen**

Wirt	Endosymbiont	Herkunft	Referenz
<i>Acanthamoeba</i> sp. UWC1	-	Universität Washington, Seattle, USA	(Fritsche, Sobek <i>et al.</i> 1998)
<i>Acanthamoeba</i> sp. UWC1	<i>Parachlamydia acanthamoeba</i>	Kläranlage, Plattling, D	(Collingro, Poppert <i>et al.</i> 2005)
<i>Acanthamoeba</i> sp. UWC1	<i>Simkania negevensis</i>	Universität Ben-Gurion, Negev, Beer Sheva, Israel	(Kahane, Gonen <i>et al.</i> 1993)
<i>Acanthamoeba</i> sp. UWC1	<i>Waddlia chondrophila</i>	Washington State Universität, Pullman, WA, USA	(Dilbeck, Evermann <i>et al.</i> 1990)

## 2.7 Primer, Sonden und Antikörper

**Tab. 9: Verwendete Primer**

Primer	Primersequenz (5'-3')	Amplifikationslänge [bp]	Spezifität	Annealingtemperatur [°C]	Referenz
PanF	TCA GAT TGA ATG CTG AC	1445	16S rRNS-Gen von <i>Chlamydiales</i>	65	(Corsaro, Venditti <i>et al.</i> 2002)
PanR	GTC ATC RGC CYY ACC TTV SRC RYY TCT				

**Tab. 10: Verwendete Sonden**

Sonde	Spezifität	5'-3'-Sequenz	Label	FA (%)
EUB-Mix (EUB-338 I,II,III)	Die meisten <i>Bacteria</i> , <i>Planctomycetales</i> , <i>Verrucomicrobiales</i>	GCT GCC TCC CGT AGG AGT GCA GCC ACC CGT AGG TGT GCT GCC ACC CGT AGG TGT	Fluos	0-50
EUB-Dope	<i>Bacteria</i>	GCT GCC TCC CGT AGG AGT	Fluos	0-50
EUK-516	<i>Eukarya</i>	ACCAGACTTGCCCTCC	Cy5	0-50
Chls-0523-Dope	<i>Chlamydiales</i>	CCT CCG TAT TAC CGC AGC	Cy3	20-30
UV7-763	<i>P. acanthamoebae</i>	TGC TCC CCC TTG CTT TCG	Cy3	30

Simneg183	<i>S. negevensis</i>	CAG GCT ACC CCA GCT CTC	Fluos	25
Wad194	<i>W. chondrophila</i>	CGC CAA ATC CCC CAC TTT	Cy3	30

**Tab. 11: Verwendete primäre Antikörper**

Antikörper	Antigen	Herkunft des Antikörpers	Verdünnung	Referenz
anti-DnaK	Heterolog expremiertes DnaK von <i>P. amoebophila</i>	Huhn / Meerschweinchen	1 : 1000	(Hörmann 2010)
anti-Sn	<i>S. negevensis</i> Elementarkörperchen	Hase / Meerschweinchen	1 : 2000	(diese Studie)
anti-Pa	<i>P. acanthamoeba</i> Elementarkörperchen	Hase / Meerschweinchen	1 : 2000	(diese Studie)
anti-Wc	<i>W. chondrophila</i> Elementarkörperchen	Hase / Meerschweinchen	1 : 2000	(diese Studie)

**Tab. 12: Verwendete sekundäre Antikörper**

Antikörper	Antigen	Modifikation	Herkunft des Antikörpers	Verdünnung	Hersteller
anti-Huhn	Huhn IgY	Cy3 <sup>1)</sup>	Esel	1:1000	Dianova
anti-Huhn	Huhn IgY	Cy2 <sup>2)</sup>	Esel	1:1000	Dianova
anti-Huhn	Huhn IgY	Cy5 <sup>3)</sup>	Esel	1:1000	Dianova
anti-Huhn	Huhn IgY	HRP <sup>4)</sup>	Ziege	1:10000	Dianova
anti-Meer- schweinchen	Meerschwein- chen IgG	Cy3	Ziege	1:1000	Dianova
anti-Meer- schweinchen	Meerschwein- chen IgG	Cy2	Ziege	1:1000	Dianova
anti-Meer- schweinchen	Meerschwein- chen IgG	Cy5	Ziege	1:1000	Dianova
anti-Meer- schweinchen	Meerschwein- chen IgG	HRP	Ziege	1:10000	Dianova
anti-Hase	Hase IgG	Cy3	Ziege	1:1000	Dianova
anti-Hase	Hase IgG	Cy2	Ziege	1:1000	GE Healthcare Bio-Sciences AB
anti-Hase	Hase IgG	Cy5	Ziege	1:1000	Dianova
anti-Hase	Hase IgG	HRP	Ziege	1:10000	Dianova

- 1) Cy3: fluorophores Indocarbocyanin
- 2) Cy2: fluorophores Carbocyanin
- 3) Cy5: fluorophores Indodicarbocyanin
- 4) HRP: Meerrettichperoxidase, von *en. horseradish* peroxidase

## 2.8 Generelle Medien und Puffer

Die Medien, Lösungen und Puffer wurden - wenn nicht anders angegeben - mittels eines Wasserdampf-Hochdruckautoklaven (H+P Varioclav® 135) für 20 Min. bei 121°C und 1 atm Überdruck sterilisiert und anschließend bei Raumtemperatur gelagert.

### 2.8.1 Medien und Puffer zur Amöbenanzucht

#### **TSY-Medium** (*en.* Trypticase Soy Broth with Yeast Extract)

Trypticase Soy Broth	30 g
Hefeextrakt	10 g
ddH <sub>2</sub> O	ad 1000 ml
pH 7,3	

#### **PYG-Medium** (*en.* Peptone-Yeast-Glucose-Medium)

Pepton	20 g
Glukose	18 g
Hefeextrakt	2 g
Natriumcitrat	1 g
MgSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O	980 mg
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O	355 mg
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	340 mg
Fe(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> * 6 H <sub>2</sub> O	20 mg
ddH <sub>2</sub> O	ad 1000 ml
pH 6,5	
Bei 110°C autoklaviert	

### 2.8.2 Puffer

#### **10 × Page's Amoebic Saline (PAS)**

NaCl	1,2 g
MgSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O	0,04 g
CaCl <sub>2</sub> * 2 H <sub>2</sub> O	0,04 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,42 g

## Material und Methoden

$\text{KH}_2\text{PO}_4$	1,36 g
$\text{ddH}_2\text{O}$	ad 1000 ml

### **1 × PAS**

10 x PAS	100 ml
$\text{ddH}_2\text{O}$	ad 1000 ml

### **PBS Stammlösung** (*en.* Phosphate buffered saline)

Lösung 1	35,6 g/l $\text{Na}_2\text{HPO}_4$
Lösung 2	27,6 g/l $\text{NaH}_2\text{PO}_4$
pH 7,2 – 7,4 (Einstellen des pH von Lösung 1 mit Lösung 2)	

### **1 × PBS**

PBS Stammlösung	50 ml
NaCl	7,6 g
$\text{ddH}_2\text{O}$	ad 1000 ml

### **SPG-Puffer**

Saccharose	75 g
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0,52 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	1,53 g
Glutaminsäure	0,75 g
$\text{ddH}_2\text{O}$	ad 1000 ml

Bei 110°C für 20 min autoklaviert

## **2.8.3 Puffer, Lösungen und Standards für Agarose-Gelelektrophorese**

Die Puffer und Lösungen für die Agarose-Gelelektrophorese wurden nicht autoklaviert.

### **10 × TBE-Puffer (Tris-Borat-EDTA-Puffer)**

Tris-HCl	162,0 g
Borsäure	27,5 g
EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure)	9,3 g
$\text{ddH}_2\text{O}$	ad 1000 ml



## Material und Methoden

pH 8.3 – 8.7

### **1 × TBE**

10 × TBE	100 ml
ddH <sub>2</sub> O	ad 1000 ml

### **Auftragspuffer**

EDTA	50 mM
Ficoll (Sigma)	25% w/v
Bromphenolblau	0,5% w/v
Xylencyanol	0,5% w/v
pH 8.0	

### **Ethidiumbromid-Stammlösung**

Ethidiumbromid	10 mg
ddH <sub>2</sub> O	1 ml

### **Ethidiumbromid-Färbebad**

Ethidiumbromid-Stammlösung	100 µl
ddH <sub>2</sub> O	ad 1000 ml

### **DNS-Längenstandard**

**GeneRuler™** 1 kb DNA Ladder (Fermentas Inc., Hanover, MD, USA)

**GeneRuler™** 100 bp DNA Ladder (Fermentas Inc., Hanover, MD, USA)

## **2.8.4 Puffer und Lösungen für die Fluoreszenz *in situ*-Hybridisierung**

### **4% PFA (Paraformaldehyd)**

1 × PBS	25 ml
Paraformaldehyd (37% w/v)	2,7 ml

### **Hybridisierungspuffer**

	<b>25%</b>	<b>30%</b>
5 M NaCl	180 µl	180 µl
1 M Tris-HCl	20 µl	20 µl

## Material und Methoden

ddH <sub>2</sub> O	550 µl	500 µl
FA (Formamid)	250 µl	300 µl
10% SDS	1 µl	1 µl
<b>Waschpuffer</b>	<b>25 %</b>	<b>30 %</b>
5 M NaCl	1490 µl	1020 µl
1 M Tris-HCl	1 ml	1 ml
0,5 M EDTA	500 µl	500 µl
ddH <sub>2</sub> O	ad 50 ml	ad 50 ml

### 2.8.5 Puffer und Lösungen für die Zellfixierung für Transmissionselektronenmikroskopie

#### 0,2 M Phosphatpuffer (pH 7,2)

NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> * 2 H <sub>2</sub> O	87 mg
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> * 2 H <sub>2</sub> O	367 mg
ddH <sub>2</sub> O	ad 100 ml

#### TEM-Fixierungslösung 1

7% Glutaraldehyd	500 µl
0,2 M Phosphatpuffer	500 µl

#### TEM-Fixierungslösung 2

2,5% Glutaraldehyd	500 µl
0,1 M Natriumkacodylpuffer mit 0,1 M Saccharose (pH 7,2)	500 µl

### 2.8.6 Puffer und Lösungen für die Immunfluoreszenzanalyse

#### FA-Blocklösung

Bovine Serum Albumin (BSA)	20 g
10 × PBS	100 ml
ddH <sub>2</sub> O	ad 1000 ml

Jeweils 50 ml Aliquots wurden bei -20°C im Gefrierschrank gelagert.

### **Mowiol-Lösung**

Mowiol	4 g
Glycerin	6 g
ddH <sub>2</sub> O	6 ml
0,2 M Tris-HCl (pH 8)	12 ml

Die Lösung wurde über Nacht bei 50°C gerührt und anschließend bei 7700 × g für 15 Min. zentrifugiert, um Luftblasen zu entfernen. Die Mowiol-Lösung wurde bei -20°C gelagert.

### **2.8.7 Puffer und Lösungen für die Westernblotanalyse**

Die Puffer und Lösungen für die Westernblotanalysen wurden mit Ausnahme von 10 × TBS nicht autoklaviert.

#### **Transferpuffer**

Glycin	14,4 g
Tris-HCl	3 g
Methanol	200 ml
ddH <sub>2</sub> O	ad 1000 ml

#### **10 × TBS (Tris-gepufferte Saline)**

Tris-HCl	12,1 g
NaCl	43,8 g
ddH <sub>2</sub> O	ad 500 ml

pH 7,5 ; Lagerung bei 4°C

#### **1 × TBS**

10 × TBS	100 ml
ddH <sub>2</sub> O	ad 1000 ml

Lagerung bei 4°C

#### **TBS-T**

10 × TBS	50 ml
----------	-------

## Material und Methoden

Tween 20	0,5 ml
ddH <sub>2</sub> O	ad 500 ml
Lagerung bei 4°C	

### Entwickler- und Fixierungslösung

SIGMA Kodak GBX Developer

SIGMA Kodak GBX Fixer

Lösungen wurden laut Herstellerangaben mit ddH<sub>2</sub>O verdünnt und bei 4°C gelagert.

### Ponceau S Lösung

Ponceau S	0,5 g
Essigsäure	1 ml
ddH <sub>2</sub> O	100 ml

## 2.8.8 Puffer und Lösungen für die Extraktionen von Außenmembranproteinen

### Sarkosyl

1 × PBS (pH 7,4)	10 ml
N-lauroylsarcosin	200 mg

### 3 × PEN

EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)	0,087 g
NaCl	5,84 g
300 mM Na <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	ad 1000 ml

### POP 05 Puffer

n-octyl-POE (Polyoxyethylen)	250 µl (0,5% w/v)
3 × PEN	ad 50 ml

### Triton X-114

1 × PBS (pH 8)	10 ml
Triton X-114	200 µl

### 2.8.9 Puffer, Lösungen und Standards für Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Puffer und Lösungen für die SDS-PAGE wurden nicht autoklaviert.

#### Unterer Puffer

Tris-HCl	90,8 g
10% (w/v) Natriumdodecylsulfat (SDS)	20 ml
ddH <sub>2</sub> O	ad 500 ml
pH 8.8	

#### Trenngel (für ein 12,5%-iges Gel)

Unterer Puffer	2 ml
ddH <sub>2</sub> O	2,66 ml
30% Polyacrylamid Lösung	3,33 ml
Ammoniumpersulfat (APS)	40 µl
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	8 µl

#### Oberer Puffer

Tris-HCl	30,3 g
10% (w/w) SDS	20 ml
ddH <sub>2</sub> O	ad 500 ml
pH 6.8	

#### Sammelgel (für ein 12,5%-iges Gel)

Oberer Puffer	0,63 ml
ddH <sub>2</sub> O	1,63 ml
30% Polyacrylamid Lösung	0,38 ml
Ammoniumpersulfat (APS)	17,5 µl
TEMED	10 µl

#### 10 × SDS-PAGE Laufpuffer

Tris-HCl	30,2 g
Glycin	144 g
SDS	10 g
ddH <sub>2</sub> O	ad 1 l

**4 × SDS-PAGE Auftragspuffer**

Tris-HCl pH 6.8	2,42 g
SDS	8 g
Bromphenolblau	0,02 g
Glycerol	40 µl
Dithiothreitol (DTT)	6,2 g
ddH <sub>2</sub> O	ad 100 ml

**Kolloidale Coomassie-Lösung**

(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	100 g
<i>ortho</i> -Phosphorsäure	20 g
Methanol	250 ml
Coomassie Brilliant Blue G-250	0,625 g
ddH <sub>2</sub> O	ad 1000 ml

**Fixierungslösung**

Ethanol	400 ml
Essigsäure	100 ml
ddH <sub>2</sub> O	ad 1000 ml

**Protein-Längenstandard**

**PageRuler™** Prestained Protein Ladder (Fermentas Inc., Hannover, MD, USA)

**2.9 Kultivierung und Stammhaltung von *Acanthamoeba sp. UWC1***

Die Amöben wurden in kleinen und großen Zellkulturflaschen mit 10 bzw. 150 ml flüssigem Medium (TSY oder PYG) bei Raumtemperatur axenisch kultiviert. Mit Hilfe eines inversen Mikroskops (Axiovert 25, Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena, D) wurden die Amöben regelmäßig auf Wachstum und Kontaminationen überprüft. Das Medium wurde wöchentlich gewechselt. Des Weiteren wurden die Kulturen alle drei Wochen mittels Fluoreszenz *in situ*-Hybridisierung auf Kontaminationen überprüft (2.12.7, Abb. 3 - 5).

Geerntet wurden die Kulturen, indem die Zellkulturflaschen abgeklopft wurden, um die angehefteten Amöben zu lösen. Das Medium mit den Amöben wurde in Greiner-

Röhrchen transferiert und bei  $5432 \times g$  und  $21^{\circ}\text{C}$  für 5 Min. abzentrifugiert. Der Überstand wurde weggeleert und das Amöbenpellet wurde - entsprechend der Weiterverwendung - in Medien (SPG, PAS, TSY, PYG) erneut aufgenommen.

## **2.10 Hochaufreinigung von *S. negevensis*, *P. acanthamoebae* und *W. chondrophila* EBs**

### Lösungen

1  $\times$  PAS

SPG

30/40/46%-ige Gastrografin® in  $\text{ddH}_2\text{O}$

50%-ige Saccharose in  $\text{ddH}_2\text{O}$

### Arbeitsablauf

Die *Acanthamoeba* sp. UWC1-Kulturen mit den jeweiligen Endosymbionten in den großen Zellkulturflaschen wurden wöchentlich nach folgendem Schema geerntet:

Die Zellkulturflaschen wurden abgeklopft, um angeheftete Amöben abzulösen und die Amöbensuspension wurde in 50 ml Greiner-Röhrchen transferiert und zentrifugiert ( $7232 \times g$ , 5 Min., Raumtemperatur (RT)). Der Überstand wurde abdekantiert und das Pellet in 1  $\times$  PAS resuspendiert. Die Suspension wurde wie zuvor zentrifugiert und der Überstand abdekantiert. Vom gewaschenen, resultierenden Zellpellet wurde das Feuchtgewicht bestimmt. Das Pellet wurde in 6,5 ml SPG/g Feuchtgewicht resuspendiert. Zusätzlich wurden 41  $\mu\text{l}$  Protease-Inhibitor/ml SPG hinzugefügt, um den Abbau von Proteinen zu verhindern.

Die in SPG aufgenommenen Amöbenzellen wurden mit dem Dounce-Homogenisator 20 Mal auf und abgezogen, dadurch aufgebrochen und anschließend abzentrifugiert ( $300 \times g$ , 10 Min.,  $4^{\circ}\text{C}$ ). Der Überstand wurde in ein neues Greiner-Röhrchen transferiert und bei  $12857 \times g$  und  $4^{\circ}\text{C}$  für 20 Min. abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 6 ml SPG aufgenommen und die Suspension wurde erst durch einen Filter mit 5  $\mu\text{m}$  Porengröße, dann durch einen 1,2  $\mu\text{m}$  Filter filtriert, um restliche intakte Amöbenzellen und größere Amöbenzellbestandteile zu entfernen.

In sechs Ultrazentrifugationsröhrchen wurden jeweils 6 ml 30%-iger Gastrografin-Lösung pipettiert, mit 1 ml der Suspension überschichtet und in der Optima™ L-100 XP Ultrazentrifuge (Beckman Coulter, CA, USA) bei  $49555 \times g$  und  $4^{\circ}\text{C}$  für 45 Min. zentrifugiert. Das Pellet wurde danach in 3 ml SPG aufgenommen und die Suspension

fünfmal erst durch gelbe (0,9 mm), dann braune (0,45 mm) Einweginjektionsnadeln gezogen, um ein möglichst gutes Homogenisat zu erhalten. Die Suspension wurde mit SPG auf ein Volumen von 6 ml aufgefüllt und davon jeweils 1 ml auf einen Gradienten aus 3 ml 30%-iger Gastrografin-Lösung und 3 ml 50%-iger Saccharose-Lösung aufgetragen und nochmals ultrazentrifugiert ( $55557 \times g$ ,  $4^{\circ}\text{C}$ , 2 Std.).

Der Homogenisierungs- und Ultrazentrifugationsschritt ( $55557 \times g$ ,  $4^{\circ}\text{C}$ , 2 Std.) wurde mit einem Gradienten aus 40 und 46%-iger Gastrografin-Lösung wiederholt.

Das Pellet wurde in 6 ml SPG resuspendiert und in 1 ml Aliquots bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

Bei der Hochaufreinigung der *S. negevensis* EBs wurden für einen Test zusätzlich zwei andere, zweite Gradienten verwendet. Hier wurde ein Gradient mit 3 ml 34%-iger und 3 ml 30%-iger Gastrografin-Lösung und ein Gradient mit 3 ml 40%-iger und 3 ml 34%-iger Gastrografin-Lösung hergestellt. Die resultierenden Pellets wurden in je 1 ml SPG aufgenommen und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Zusätzlich wurde die Interphase des Gradienten aus 40 und 46%-iger Gastrografin-Lösung mittels einer sterilen Einweginjektionsnadel, mit welcher man das aus Kunststoff bestehende Ultrazentrifugationsröhrchen seitlich einstechen konnte, abgenommen. Die Interphase wurde 30 Min. bei  $17949 \times g$  und  $4^{\circ}\text{C}$  in der Zentrifuge pelletiert. Das Pellet wurde in 1 ml SPG aufgenommen und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### **2.11 Partielle Aufreinigung von EBs**

Die Umweltchlamydien EBs der infizierten *Acanthamoeba* sp. UWC1 wurden auch partiell aufgereinigt. Durch die partielle Aufreinigung erhält man zwar mehr und noch infektiösere EBs (Howard, Orenstein *et al.* 1974), aber einen hohen Grad an Verunreinigungen durch Wirtszellbestandteile.

Die Amöben wurden wie in 2.10 beschrieben geerntet und aufgebrochen. Nach 10 minütiger Zentrifugation bei Raumtemperatur und  $300 \times g$  wurde der Überstand erst durch einen  $5 \mu\text{m}$  und dann durch einen  $1,2 \mu\text{m}$  Filter gezogen, um Wirtszellen zu entfernen. Die EBs wurden für 20 Min. bei  $17949 \times g$  und  $4^{\circ}\text{C}$  abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet wurde in 1 ml SPG resuspendiert und bis auf Weiteres bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.



## 2.12 Generelle Methoden für das Screening von EBs

### 2.12.1 DNS-Isolierung aus hochaufgereinigten EBs

Von den eingefrorenen 1 ml EB-Aliquots (2.10) wurden 0,5 ml für die DNS-Isolierung verwendet. Bei 37°C wurden die EBs aufgetaut und anschließend abzentrifugiert (17949 × g, 30 Min., 4°C).

Das Pellet wurde in 180 µl ATL Puffer aufgenommen und die DNS wurde laut Angaben des Herstellers (Qiagen) mit dem DNeasy Tissue Kit (Tab. 5) isoliert. Statt Puffer AE wurde die DNS in 50 µl ddH<sub>2</sub>O aufgenommen. Die DNS-Konzentration wurde mit dem Spektralphotometer (NanoDrop® ND-1000) bestimmt.

### 2.12.2 Vervielfältigung von DNS mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

#### Lösungen

MgCl<sub>2</sub> (25 mM)

Nukleotid-Mix (2,5 mM je dNTP)

10 × Ex *Taq* Polymerase Puffer

*Taq* DNS Polymerase (5 U/µl)

Vorwärts-Primer (50 pmol/µl)

Rückwärts-Primer (50 pmol/µl)

ddH<sub>2</sub>O (Mayrhofer Pharmazeutika GmbH & Co KG, Leonding, A)

#### Arbeitsablauf

Zunächst wurden alle benötigten PCR-Reaktionsgefäße und Lösungen, außer der *Taq* Polymerase und der zu analysierenden DNS, unter der PCR-Sterilbank für 15 Min. mit UV-Licht bestrahlt, um Kontaminationen vorzubeugen.

Der Standardansatz wurde nach folgendem Schema hergestellt:

#### **Pro Ansatz**

10fach Puffer	5 µl
MgCl <sub>2</sub>	4 µl
Nukleotidmix	4 µl
Enzym ( <i>Taq</i> )	0,2 µl

Vorwärts-Primer PanF	1 µl
Rückwärts-Primer PanR	1 µl
DNS	100 ng
ddH <sub>2</sub> O	ad 50 µl

Zudem wurden bei jeder PCR eine Positiv- und eine Negativ-Kontrolle (keine DNS-Matrize) durchgeführt. Bei der Positivkontrolle handelte es sich um ein *P. amoebophila* DNS-Isolat aus einer fortlaufenden Kultur einer Kollegin, das bereits erfolgreich verwendet wurde.

Folgendes PCR-Programm wurde verwendet:

**Tab. 13: Programmierung des Cyclers für die PCR**

	°C	Sek.	
Denaturierung	95	180	
Denaturierung	95	30	35 × Zyklen
Annealing	65	30	
Elongation	72	60	
Finale Elongation	72	420	

Nach der PCR wurden die PCR-Produkte bis auf Weiteres bei 4°C gelagert und, wie in nachfolgenden Punkten beschrieben, weiterverarbeitet.

### 2.12.3 Qualitative DNS-Analyse mittels Agarose-Gelelektrophore

#### 2.12.3.1 Analyse der PCR-Produkte

##### Lösungen

1 × TBE

Auftragspuffer

DNS-Längenmarker

EtBr-Färbebad

##### Arbeitsablauf

3 µl eines 1 kb DNS-Längenmarkers sowie 5 µl Auftragspuffer vermischt mit 5 µl der zu untersuchenden PCR-Produkte wurden auf ein 1%-iges Agarosegel aufgetragen. Die DNS wurde bei 110 V (Volt) für eine Stunde aufgetrennt. Das Gel wurde für 30 Min. bei RT im Ethidiumbromid-Färbebad gefärbt, Banden im Gel mittels UV-Transiluminator (Biostep, Jahnsdorf, D) bei einer Wellenlänge von 312 nm sichtbar gemacht und digital abfotografiert.

### **2.12.3.2 Restriktionsverdau der amplifizierten 16S rRNS-Gene**

Der Restriktionsverdau wurde durchgeführt, um bereits vor der Sequenzierung der 16S rRNS-Gene mögliche Kontaminationen auszuschließen.

Hierfür wurden 5 µl der jeweiligen PCR-Produkte oder einer Positiv- oder einer Negativkontrolle mit 1 µl Puffer O, 0,2 µl *Vsp*I und 3,8 µl ddH<sub>2</sub>O in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß zusammen pipettiert. Das Gemisch wurde für drei Stunden bei 37°C inkubiert. Nach dem Verdau wurden jeweils 5 µl Auftragspuffer mit dem gesamten Ansatz vermischt und auf ein 2%-iges Agarosegel geladen. Zudem wurde 3 µl eines 100 bp DNS-Längenmarkers geladen. Die verdauten PCR-Produkte wurden im Gel für 90 Min. bei 80 V getrennt und anschließend wie oben erwähnt gefärbt und digital abfotografiert.

### **2.12.4 Aufreinigung von PCR-Produkten**

Die PCR-Produkte wurden mit dem Qiaquick PCR Purification Kit von Qiagen (Tab. 5) aufgereinigt und in 50 µl ddH<sub>2</sub>O aufgenommen.

### **2.12.5 Quantitative, photometrische DNS-Analyse**

Mit Hilfe eines Spektralphotometers (NanoDrop<sup>®</sup> ND-1000) wurde die Konzentration der Nukleinsäuren bestimmt. Hierfür wurden 1,5 µl der zu bestimmenden DNS-Lösung geladen und bei  $\lambda = 260$  nm gemessen.

### **2.12.6 Sequenzierung der PCR-Produkte**

Die PCR-Produkte wurden durch Mag. Christian Baranyi und Martina Grill (Department für Mikrobielle Ökologie, Universität Wien, A) nach dem Prinzip der Kettenabbruchmethode durchgeführt. Hierfür wurden der ABI 3130xl DNA sequencer und der BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit v3.1 (Applied Biosystems) verwendet. Für die Sequenzierung wurden die gleichen Primer wie für die PCR genutzt (Tab. 9). Mit der Software FinchTV (Tab. 2) (Geospiza) wurden die erhaltenen Sequenzen Korrektur gelesen.

Zuletzt konnte durch das Programm BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) die ermittelte Sequenz mit anderen Sequenzen in der NCBI-Datenbank verglichen werden,

um die ähnlichste Sequenz zu finden und aufgrund identer Übereinstimmungen Kontaminationen auszuschließen.

## **2.12.7 Fluoreszenz *in situ*-Hybridisierung (FISH)**

### **2.12.7.1 Fixierung von Amöbenzellen mit 4 % PFA auf Teflon-Objektträgern**

Zweimal 2 ml einer dicht bewachsenen Amöbenkultur wurden durch Zentrifugation (5 Min.,  $2655 \times g$ ,  $20^{\circ}\text{C}$ ) geerntet. Das Pellet wurde mit 0,5 ml  $1 \times \text{PAS}$  gewaschen und je nach Pelletgröße in 50-150  $\mu\text{l}$   $1 \times \text{PAS}$  aufgenommen.

20  $\mu\text{l}$  der Suspension wurden in eine Aussparung (Well) eines Teflon-Objektträgers pipettiert und für mindestens 20 Min. nicht abgenommen, damit sich die Amöben auf dem Objektträger anheften konnten. Nach der Abnahme der Suspension wurden 20  $\mu\text{l}$  4% Paraformaldehyd für 10 Min. auf die angehefteten Amöben pipettiert, um die Zellen zu fixieren. Das PFA wurde abgenommen und die Wells wurden mit 20  $\mu\text{l}$   $\text{ddH}_2\text{O}$  durch Auf- und Abpipettieren gewaschen.

Der Objektträger wurde getrocknet und bis auf weiteres in einem Greiner-Röhrchen im Gefrierschrank bei  $-20^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

### **2.12.7.2 *In situ*-Hybridisierung**

Die Hybridisierungs- und Waschpuffer wurden gemäß 2.8.4 für die jeweiligen Formamid-Konzentrationen der einzelnen Sonden (Tab. 10) hergestellt. 10  $\mu\text{l}$  Hybridisierungspuffer und 1  $\mu\text{l}$  jeder verwendeten Sonde wurden auf die Probe auf dem Teflon-Objektträger pipettiert. Der restliche Hybridisierungspuffer wurde auf ein Stück Zellstoffpapier in einem Greiner-Röhrchen gegossen, um einer Austrocknung des Ansatzes entgegenzuwirken. Der Teflon-Objektträger wurde vorsichtig in das Greiner-Röhrchen gegeben und zur Inkubation im Dunkeln anschließend für 1,5 bis 3 Stunden waagrecht in den  $46^{\circ}\text{C}$ -Trockenschrank gestellt. Die Inkubation fand im Dunkeln statt, um ein Ausbleichen der Fluoreszenzfarbstoffe zu verhindern.

Nach dem Hybridisierungsvorgang wurde der Teflon-Objektträger 10 Min. in einem auf  $48^{\circ}\text{C}$  vorgeheizten Waschpuffer gewaschen. Zuletzt wurde der Objektträger für 2-3 Sek. in eiskaltes  $\text{ddH}_2\text{O}$  gegeben und mit einem komprimierten Luftstrahl möglichst schnell durch Abblasen getrocknet.

Der Objektträger wurde bis auf Weiteres in einem Greiner-Röhrchen im -20°C-Gefrierschrank aufbewahrt.

### **2.12.7.3 Auswertung mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie**

Die Fluoreszenz *in situ*-Hybridsierung wurde mit Hilfe eines konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena, D) analysiert. Die Teflon-Objektträger wurden mit Citifluor eingebettet und mit einem Deckgläschen versehen.

Mit der LSM-Image Browser Software (Tab. 2) konnten die aufgenommenen Bilder bearbeitet werden.

## **2.12.8 DAPI- und DIOC<sub>6</sub>-Färbung der hochaufgereinigten EBs**

### **2.12.8.1 Fixierung der EBs auf Teflon-Objektträgern**

Die hochaufgereinigten EBs wurden im Verhältnis 1:30 oder 1:10 mit 1 × PBS verdünnt. Jeweils 20 µl der Verdünnung wurden auf die Objektträger pipettiert und für ca. 40 Min. eingetrocknet. Auf die Zellen wurde für 10 Min. 4% Paraformaldehyd gegeben und wieder abgenommen. Mit 20 µl ddH<sub>2</sub>O wurden die fixierten Zellen durch Auf- und Abpipettieren gewaschen und luftgetrocknet, um mit den Färbungen fortzufahren.

### **2.12.8.2 Färbung der EBs mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)**

Der Fluoreszenzfarbstoff DAPI interkaliert in doppelsträngige DNS und erlaubt bei einer Anregung mit ultraviolettem Licht eine Visualisierung der DNS. Die DAPI-Stammlösung (1 mg/ml) wurde mit ddH<sub>2</sub>O 1:10000 verdünnt und bei 4°C gelagert. Auf die mit 4% PFA fixierten EBs (2.12.8.1) wurde 10 µl DAPI-Verdünnung pipettiert und für 5 Min. im Dunkeln inkubiert. Das DAPI wurde abgenommen und die Wells wurden mit 20 µl ddH<sub>2</sub>O gewaschen. Die Objektträger wurden im Dunkeln luftgetrocknet, damit die Färbung nicht ausbleich.

### **2.12.8.3 Färbung der EBs mit 3,3'-Dihexyloxacarbocyaninioidid (DIOC<sub>6</sub>)**

Um den Grad der Verunreinigung mit Amöbenzellbestandteilen in den hochaufgereinigten EBs zu bestimmen wurde der Fluoreszenzfarbstoff DIOC<sub>6</sub> verwendet. Dieser

färbt Membranen, Mitochondrien und das Endoplasmatische Retikulum der Wirtszellen (Koning, Lum *et al.* 1993) sowie die Membranen der EBs grün, wenn mit blauem Licht bestrahlt wird. Die Stammlösung (1 µg/ml) wurde mit ddH<sub>2</sub>O 1:500 verdünnt und bei 4°C gelagert. 10 µl DIOC<sub>6</sub> wurden nach der DAPI-Färbung auf die Zellen pipettiert. Nach 10-minütiger Inkubation im Dunkeln, wurde das DIOC<sub>6</sub> wieder abgenommen und die Wells wurden zweimal mit 20 µl ddH<sub>2</sub>O gewaschen. Letztlich wurden die Objektträger im Dunkeln, um dem Ausbleichen der Farbstoffe entgegenzuwirken, luftgetrocknet.

### **2.12.8.4 Auswertung mittels Epifluoreszenzmikroskopie**

Die mit DAPI und DIOC<sub>6</sub> gefärbten Zellen auf den Teflon-Objektträgern wurden mit Citifluor eingebettet und auf die Objektträger wurden Deckgläschen aufgelegt. Unter dem Epifluoreszenzmikroskop AxioPlan 2 imaging (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena, D) wurden die Zellen analysiert.

Bilder der visualisierten Zellen wurden mit der CCD-Kamera (AxioCam HRc, Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena, D) aufgenommen und mit der Software AxioVision 4 (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena, D) (Tab. 2) bearbeitet.

## **2.12.9 Zellfixierung für Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)**

### **2.12.9.1 Zellfixierung für TEM 1**

Direkt nach der Hochaufreinigung der EBs wurde ein 0,5 bis 1 ml Aliquot fixiert. Die Zellen wurden in Eppendorf-Reaktionsgefäßen mit rundem Boden für 30 Min. bei 20817 × g und Raumtemperatur abzentrifugiert. Das Medium wurde mit einer Mikropipette abgenommen. Das resultierende Pellet wurde in 1 ml 3,5% Glutaraldehyd in 0,1 M Phosphatpuffer (pH 7,2) aufgenommen, indem vorsichtig mit dem Finger das geschlossene Eppendorf-Reaktionsgefäß von unten angetippt wurde, um die Strukturen der EBs möglichst nicht zu zerstören. Die fixierten Zellen wurden bei 4°C über den Postweg zur weiteren Verarbeitung und Transmissionselektronenmikroskopie an Ass. Prof. Rok Kostanjsek (Department of Biology, Biotechnical Faculty, University of Ljubljana, Slovenia) versandt.

#### **2.12.9.2 Zellfixierung für TEM 2**

1 ml der hochaufgereinigten *Simkania negevensis* EBs wurden direkt nach der Hochaufreinigung an Mag.<sup>a</sup> Lena König (Department für Mikrobielle Ökologie, Universität Wien, A) weitergegeben, die die Zellfixierung mit Natriumkakodylpuffer einleitete und die weiteren Schritte inklusive der Transelektronenmikroskopie übernahm.

### **2.13 Antikörperproduktion: Immunfluoreszenz- und Westernblotanalyse**

#### **2.13.1 Produktion von Antikörpern gegen EBs**

Die hochaufgereinigten EBs (2.10) der jeweiligen Umweltchlamydien wurden für die Antikörperproduktion verwendet. Hierfür wurden die EBs mittels DAPI-Färbung auf einem Filter ausgezählt (2.13.2). Es wurden für die drei hochaufgereinigten Chlamydien EBs je zwei Meerschweinchen und ein Hase von Eurogentec in Belgien immunisiert. Zuvor wurden von jeweils zehn Meerschweinchen und zehn Hasen durch einen Präimmunserentest die geeignetsten Tiere für eine Immunisierung ermittelt. Das Präimmunserum der einzelnen Tiere wurde durch eine Immunfluoreszenz- (2.13.5) und eine Westernblotanalyse (2.13.6) getestet. Wäre es hier zu Reaktionen gegen die Chlamydien EBs und/oder Amöben gekommen, wären diese Tiere zur Herstellung nicht geeignet gewesen. Die ausgezählten EBs wurden für die Meerschweinchen auf eine Zellzahl von  $1,25 \cdot 10^7$  und für den Hasen auf  $5 \cdot 10^7$  in SPG aliquotiert. Den Tieren wurde dreimal innerhalb eines Monats entsprechende EB-Aliquote injiziert.

#### **2.13.2 Auszählung der hochaufgereinigten EBs mittels DAPI und DIOC<sub>6</sub>-Färbung auf einem Filter**

Die Aliquots der Hochaufreinigungen (2.10) wurden bei 37°C aufgetaut und auf Eis gelagert. Die EBs von *Parachlamydia acanthamoebae* UV7 wurden 1:5000, und von *Simkania negevensis* und *Waddlia chondrophila* jeweils 2:5000 mit sterilem  $1 \times$  PBS verdünnt. Der Filturtaufsatz wurde mit EtOH sterilisiert und zusammengebaut. Ein Stützfilter sowie ein Filter mit 0,2 µm Porengröße (Isopore<sup>TM</sup> Polycarbonat-Membranfilter) wurden verwendet. Zunächst wurden etwa 5 ml steriles  $1 \times$  PBS mit der

Vakuumpumpe im Filterturm abgesaugt. Dann wurde die vorher gevortexte EB-Suspension abgesaugt und mit  $1 \times$  PBS nachgespült. Von einer 1:1000-DAPI-Verdünnungslösung wurden 200  $\mu$ l auf den Filter getropft und der Filterturm wurde mit Alufolie abgedeckt. Nach 5 Min. Inkubation wurde das DAPI abgesaugt und mit  $1 \times$  PBS nachgewaschen, das wiederum abgesaugt wurde. Ein 10 Min. Inkubationsschritt und der Waschschrift wurden mit einer 1:500-Verdünnung von DIOC<sub>6</sub> wiederholt. Der Filter wurde mit einer Pinzette auf einen Objektträger gelegt und mit Citifluor eingebettet. Die Anzahl der EBs wurde mittels eines Epifluoreszenzmikroskops auf je 10 Feldern ( $10 \times 10$  Kleinquadrate) im Zählkular ausgezählt.

Die Zellzahl pro ml wurde nach folgendem Schema bestimmt:

$$\frac{\text{Zellzahl}}{\text{ml}} = \frac{\text{gezählte Zellen in der Probe}}{\text{Zahl der ausgezählten Felder (10)}} * M * V$$

M ... Mikroskopfaktor = 11264

V... Verdünnungsfaktor: ausgezählt für 1  $\mu$ l = 1000 und für 2  $\mu$ l = 500

### 2.13.3 Behandlung der Antikörper mit Amöbenlysate

Die Seren wurden mit Amöbenlysate behandelt, um Antikörper, die Amöbenproteine binden würden, zu entfernen.

Hierfür wurden mehrere dicht bewachsene *Acanthamoeba* sp. UWC1-Kulturen in kleinen Kulturflaschen durch Abzentrifugieren (5 Min., RT, 5432  $\times$  g) geerntet. Das Pellet wurde in je 1 ml FA-Blocklösung resuspendiert. Die Amöben wurden durch 5 Wiederholungen von jeweils zweiminütigen Einfrier- und Auftauschritten in einem EtOH/Trockeneis-Gemisch und im 42°C-Wasserbad zerstört. Die Amöbenlysate-Aliquote wurden bei -20°C gelagert.

Die Antikörperseren wurden 1:1 mit dem Amöbenlysate gemischt und gevortext. Das Gemisch wurde über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Suspension erneut gevortext und für eine weitere Stunde im Kühlschrank inkubiert. Die Antikörper, die an Amöbenzellbestandteile binden, wurden durch Zentrifugation (2 Min., RT, 5432  $\times$  g) entfernt. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und bei 4°C gelagert.



### **2.13.4 Zellfixierung von Amöben für die Immunfluoreszenzanalyse**

24-Well-Platten (Mikrotiterplatten) wurden mit sterilen Glasplättchen bestückt. Je 0,5 ml von einer dicht bewachsenen, infizierten und uninfizierten Amöbenkultur wurden in die Wells pipettiert. Für ein Anheften der Amöben wurde das Medium (TSY oder PYG) für mindestens zwei Stunden in den Wells gelassen. Das Medium wurde abgenommen und die Wells wurden mit 0,5 ml  $1 \times$  PBS gewaschen. Die Amöben wurden danach entweder für 10 min mit Methanol oder 30 min mit 4% PFA fixiert. Nach vollständiger Abnahme des MeOH bzw. 4% PFA wurden die Glasplättchen mit 0,5 ml  $1 \times$  PBS bedeckt. Die Platten wurden mit Parafilm abgeschlossen und im Kühlschrank bis zu zwei Wochen für eine Weiterverwendung gelagert.

### **2.13.5 Immunfluoreszenzanalyse**

#### Lösungen

$1 \times$  PBS

0,05% Tween 20 in  $1 \times$  PBS

Lysozym

Lysozypuffer (10 mM Tris-HCl pH 6,5)

FA-Blocklösung

Mowiol

#### Arbeitsablauf

Alle Inkubationsschritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Um die mit 4% PFA fixierten Zellen permeabel zu machen wurden diese, anders als die MeOH fixierten Zellen, vorbehandelt.

Das  $1 \times$  PBS wurde abpipettiert und die Zellen wurden in 0,5 ml  $1 \times$  PBS mit 0,05% Tween pro Well für 25 Min. inkubiert. Diese Lösung wurde abgenommen und die Zellen wurden mit 0,5 ml Lysozypuffer mit 5  $\mu$ g/ml Lysozym für 60 Min. inkubiert.

Die permeabilisierten oder mit MeOH fixierten Zellen wurden mit 0,5 ml FA-Blocklösung inkubiert. Die Blocklösung wurde wieder abgenommen und 300  $\mu$ l des in FA-Blocklösung verdünnten primären Antikörpers (Tab. 11) wurde zu den Zellen pipettiert. Nach einer Inkubation von 60 Min. wurden die Zellen in den Wells dreimal mit jeweils 0,5 ml  $1 \times$  PBS gewaschen. Dann wurden 300  $\mu$ l des in FA-Blocklösung verdünnten sekundären Antikörpers (Tab. 12) zu den Zellen pipettiert und für 60 Min. im

Dunkeln inkubiert. Nach erneuten Waschschritten mit  $1 \times$  PBS wurden die Glasplättchen auf Objektträgern mit Mowiol eingebettet. Der Objektträger wurde für 60 Min. an Luft im Dunkeln gelagert, damit das Mowiol aushärten konnte. Die Zellen wurden letztlich unter dem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (2.12.7.3) analysiert.

### 2.13.6 Westernblotanalyse

#### Lösungen

Transferpuffer

$1 \times$  TBS

TBS-T

Ponceau S Lösung

5 % Magermilchpulver in  $1 \times$  TBS

Entwickler- und Fixierungslösung

#### Arbeitsablauf

Die zu untersuchenden Proteine wurden durch SDS-Page (2.15) aufgetrennt. Danach wurde das ungefärbte Trenngel für 15 Min. im Transferpuffer equilibriert. Eine Polyvinylidenfluorid- (PVDF) Membran und zwei extra dicke Whatman® Chromatographie-Papiere wurden in der Größe des Trenngels zugeschnitten. Die PVDF-Membran wurde für 5 Min. unter Schütteln in Methanol inkubiert. Nach Abnahme des Methanols wurde die PVDF-Membran für 5 Min. in  $\text{ddH}_2\text{O}$  gewaschen. Das Trenngel und die beiden Papiere wurden für 5 Min. in Transferpuffer inkubiert. Nach der Equilibrierung im Transferpuffer wurde das "Blottingsandwich" zusammengebaut. Die PVDF-Membran und das Trenngel wurden zwischen die zwei dicken Whatman® Chromatographie-Papiere gelegt. Geblottet wurde mit einer "Trans-Blot® SD SEMI-DRY Transfer Cell" (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D) für 35 Min. bei 10 V.

Mit einer Ponceau S Färbemethode wurde überprüft, ob auf die Membran Proteine transferiert wurden. Die Membran wurde unter ständigem Schütteln für 5 Min. in der Ponceau S Lösung inkubiert und 5 Min. in  $\text{ddH}_2\text{O}$  entfärbt. Erschienen die Proteinbanden in rot, konnte man von mindestens 0,5 - 1  $\mu\text{g}$  transferierten Proteinen ausgehen, da hier das Detektionslimit dieser Methode liegt (Salinovich und Montelaro 1986).

Danach wurde die Membran über Nacht in 5% Magermilchpulver in  $1 \times$  TBS unter ständigem Schütteln bei 4°C inkubiert, um unspezifisches Binden der Proteine zu unterbinden. Die Membran wurde am nächsten Tag für zweimal 1 Min. in 10 ml  $1 \times$  TBS

gewaschen und 60 Min. in 10 ml 1 × TBS-T mit dem verdünnten primären Antikörper (Tab. 11) inkubiert. Danach wurde die Membran dreimal für je 15 Min. in 1 × TBS-T gewaschen. Der Inkubationsschritt wurde mit dem sekundären, HRP-markierten Antikörper (Tab. 12) mit einer 1:10000-Verdünnung in 10 ml 1 × TBS-T wiederholt. Die Membran wurde anschließend zweimal in 10 ml 1 × TBS-T und einmal in 10 ml 1 × TBS gewaschen. Dann wurde die Membran laut Herstellerangaben mit dem Western Lightning Chemiluminescence Plus Kit (Tab. 5) behandelt. In einer Dunkelkammer wurde jeweils ein photographischer Film für kurze Zeitpunkte von 1 - 60 Sek. auf die Membran gelegt und anschließend wurde der Film in SIGMA Kodak GBX Developer entwickelt. Nach kurzer Entwicklungszeit im Dunkeln, bei der mit einer Rotlichtlampe auftretende Banden überprüft wurden, konnte der Film im SIGMA Kodak GBX Fixer fixiert werden und in ddH<sub>2</sub>O gewaschen werden. Nachdem der Film getrocknet wurde, konnte dieser mit Hilfe eines Scanners digitalisiert werden.

### **2.14 Extraktion von Außenmembranproteinen aus hochaufgereinigten EBs mit verschiedenen Detergentien**

Bei der Extraktion der Außenmembranproteine wurde mit drei verschiedenen Detergentien gearbeitet: Sarkosyl, n-octyl Polyoxyethylen und Triton X-114.

Für die Extraktion wurden die hochaufgereinigten EBs aus 2.10 verwendet. Die in 1 ml SPG eingefrorenen hochaufgereinigten EBs wurden im Wasserbad bei 37°C aufgetaut. Die Aliquots wurden in vorher abgewogene Eppendorf-Reaktionsgefäße pipettiert und bei 4°C und 17949 × g für 30 Min. zentrifugiert. Nachdem der Überstand abpipettiert wurde, wurde das Gewicht des feuchten Pellets bestimmt. Bei allen Extraktionen wurde mit einem feuchten Pelletgewicht von ca. 5 - 9 mg gearbeitet.

#### **2.14.1 Extraktion von Außenmembranproteinen mit Sarkosyl**

##### Lösungen

1 × Phosphat Buffer Saline (PBS)

N-lauroylsarcosin

Protease-Inhibitor

5 mM MgCl<sub>2</sub>

Benzonase

4 × SDS-PAGE-Auftragspuffer (Lämmli-Puffer)

### Arbeitsablauf

Das Pellet wurde in 400 µl 1 × PBS mit 2% N-Lauroylsarcosin (Sarkosyl) resuspendiert und zur Suspension wurden 57,1 µl 7 × Protease-Inhibitor pipettiert. Die Suspension wurde fünfmal zu je 2 Min. mit dem "Ultrasonic Cleaner SC100T" sonifiziert. 5 mM MgCl<sub>2</sub> und 50 U Benzonase wurden zu der Suspension pipettiert und das Gemisch bei 37°C für eine Stunde auf dem Schüttler inkubiert. Anschließend wurde die Suspension bei 17949 × g und RT für 10 Min. zentrifugiert. Der Überstand wurde mit einer Mikropipette abgenommen und zu dem Pellet wiederum 400 µl 1 × PBS mit 2% N-lauroylsarcosin gegeben. Der Vorgang wurde ohne weitere Zugabe von MgCl<sub>2</sub> und Benzonase wiederholt.

Das resultierende Protein-Pellet wurde je nach Größe in 20 - 40 µl Lämmli-Puffer aufgenommen und bei -20°C gelagert.

### **2.14.2 Extraktion der Außenmembranproteinen mit n-octyl Polyoxyethylen**

#### Lösungen

POP05 Puffer

Dithiothreitol (DTT)

Protease-Inhibitor

Aceton

Benzonase

4 × SDS-PAGE-Auftragspuffer (Lämmli-Puffer)

#### Arbeitsablauf

Das abgewogene Pellet der hochaufgereinigten EBs wurde in 100 µl POP05 Puffer mit 100 mM darin gelöstem DTT pro 3 mg EB-Gewicht aufgenommen. Zu der Suspension wurden 140 µl/ml der 7 × Protease-Inhibitor-Stammlösung pipettiert. Nach einstündiger Inkubation auf dem Schüttler bei 37°C, um die Außenmembranproteine zu lösen, wurde für 10 Min. und 17949 × g bei 4°C zentrifugiert. Mit dem Überstand, in dem die Außenmembranproteine gelöst waren, wurde weitergearbeitet. Das dreifache Volumen des Überstandes wurde an eisgekühltem Aceton zugegeben, um die gelösten Außenmembranproteine zu fällen, und der Ansatz wurde eine Stunde bei -20°C inkubiert. Wiederum wurde wie zuvor zentrifugiert und das Pellet in 20 - 40 µl 4 × SDS-PAGE-

Auftragspuffer aufgenommen. Zuletzt wurde 1 µl Benzonase zugegeben und für eine Stunde bei RT inkubiert.

### 2.14.3 Extraktion von Außenmembranproteinen mit Triton X-114

#### Lösungen

1 × PBS (pH 8)

Triton X-114

4 × SDS-PAGE Auftragspuffer (Lämmli-Puffer)

#### Arbeitsablauf

Das hochaufgereinigte EB-Pellet wurde in 250 µl eiskaltem 2% Triton X-114 in 1 × PBS (pH 8) aufgenommen. Die Suspension wurde 10 Min. mit dem “Ultrasonic Cleaner SC100T“ sonifiziert und dann auf Eis gestellt. Die Suspension wurde in einem kochenden Wasserbad erhitzt, damit sich die Phasen voneinander trennen. Bei 37°C und 400 × g wurde das Gemisch für 10 Min. zentrifugiert. Die wässrige obere Phase wurde mit der Mikropipette abgenommen. Zu der unteren Phase, in der die Außenmembranproteine enthalten waren, wurden 250 µl 1 × PBS pipettiert und der Extraktionsschritt wurde wiederholt. Jeweils 15 µl der unteren Phase wurden letztlich mit 5 µl 4 × SDS-PAGE-Auftragspuffer gemischt und im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt.

### 2.15 Analyse von Proteinen durch SDS-PAGE

Die Lösungen für das Trenn- und Sammelgel wurden gemäß 2.8.9 vorbereitet. Nachdem die 12,5%-igen Gele hergestellt wurden und über Nacht im Kühlschrank aushärten konnten, wurden diese in die SDS-PAGE-Apparatur gegeben. Die Kammer der Apparatur wurde mit 1 × SDS-Laufpuffer befüllt und die einzelnen Ladetaschen des Gels ausgespült. Für Probeläufe und den 1. Lauf der Massenspektrometrie-Messung (MS-Messung) - mit Sarkosyl extrahierte *S. negevensis*-Außenmembranproteinfraktionen - wurden von den in 4 × SDS-PAGE-Auftragspuffern befindlichen Proteinen unterschiedliche Konzentrationen und zusätzlich 3 µl des Protein Längenmarkers (PageRuler™ Prestained Protein Ladder) geladen. Die Proteine wurden für 1½ Stunden bei 110 V aufgetrennt. Nach dem Gellauf wurde das abgetrennte Trenngel für 5 Min. mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen und anschließend mit der Fixierungslösung für 20 Min. auf dem Schüttler inkubiert. Nach zwei Waschschritten mit ddH<sub>2</sub>O für 10 Min. wurde das Gel über

Nacht mit kolloidalem Coomassie gefärbt. Mit  $\text{ddH}_2\text{O}$  wurde das Gel zweimal je 30 min entfärbt.

Das Gel des 1. Laufs der MS-Messung wurde zuletzt in eine Klarsichtfolie gegeben, eingescannt und für weitere Zwecke im Kühlschrank aufbewahrt (2.16).

Für das Gel des 2. Laufs der MS-Messung - mit allen drei Detergentien extrahierte *S. negevensis*-Außenmembranproteinfraktionen - wurde ein 10%-iges Mini-Protean TGX Precast Gel (Bio-Rad Laboratories GmbH, Munich, D) verwendet, um die Verunreinigungen durch Keratine möglichst gering zu halten.

Die Gel-Apparatur wurde vor der Verwendung mit Seife und Ethanol gereinigt und anschließend mit  $\text{ddH}_2\text{O}$  ausgespült. Da das gekaufte Gel 10%-ig war, wurde der Gellauf mit 100 V für ca. 1½ Stunden ausgeführt. Das Gel für den 2. Lauf der Messung wurde in einer Petrischale mit  $\text{ddH}_2\text{O}$  bedeckt und mit einem Parafilm verschlossen. Das Gel wurde in der verschlossenen Petrischale abfotografiert, um Kontaminationen durch Keratine zu verhindern. Dann wurde das Gel für die 2. MS-Messung an Univ. Ass. Dr. Dorothea Anrather weitergegeben.

### **2.16 Identifikation von Proteinen durch Massenspektrometrie**

Für die massenspektrometrische Analyse der Außenmembranproteinfraktionen von *Simkania negevensis* wurden bei einem 1. Lauf der MS-Messung einzelne Proteinbanden eines 12,5%-igen selbstgegossenen SDS-Polyacrylamidgels (Abb. 15) und bei einem 2. Lauf ganze Bahnen eines 10%-igen gekauften Gels (Abb. 15) verwendet.

#### **2.16.1 Probenvorbereitung für die Massenspektrometrie**

##### Lösungen

Acetonitril (ACN)

50 mM Ammoniumbicarbonat (ABC-Puffer)

Iodacetamidlösung (10mg/ml in ABC-Puffer)

10 mM DTT in ABC-Puffer

Trypsin

0,1% und 10% Trifluoressigsäure (TFA)

$\text{ddH}_2\text{O}$

### Arbeitsablauf

Für den 1. Lauf der MS-Messung wurden vorsichtig drei markante Banden des selbstgegossenen, 12,5%-igen SDS-Polyacrylamidgels (Abb. 15) mit einer sterilen Skalpellklinge ausgeschnitten, in vier Stücke geteilt und in sterile Eppendorf-Reaktionsgefäße gegeben. Die Klinge wurde zwischendurch mit EtOH abgespült. Die Gelstücke in den Eppendorf-Reaktionsgefäßen wurden bis zur Weiterverarbeitung bei -80°C gelagert.

Die zu analysierenden Gelstücke wurden dreimal je 10 Min. mit 200 µl  $\text{ddH}_2\text{O}$  bei RT im Thermomixer unter Schütteln bei 800 rpm gewaschen. 200 µl ABC-Puffer und 100 µl Acetonitril (ACN) wurden zu den Gelstücken pipettiert, kurz gevortext und für 15 Min. bei RT und 900 rpm geschüttelt. Die Flüssigkeit wurde abgenommen und der Vorgang wurde nochmals wiederholt, bis die Gelstücke vollkommen entfärbt waren.

Dehydratisiert wurde mit 160 µl ACN und 5-minütigem Schütteln bei RT und 900 rpm. Nachdem ACN wieder abgenommen worden war, wurden die Gelstücke in der Speedvak für 10 min bei RT getrocknet.

Die Proben wurden reduziert, indem 200 µl 10 mM DTT in ABC-Puffer zugegeben wurde und 30 Min. im Thermomixer bei 56°C und 900 rpm geschüttelt wurde. Nachdem der mit DTT versetzte ABC-Puffer wieder abgenommen worden war, wurden 160 µl ACN zugegeben und unter Schütteln bei 900 rpm und RT für 5 Min. inkubiert. Im Anschluss folgte die Abnahme der ACN-Lösung und eine Zugabe von 200 µl Iodacetamidlösung, damit die Proteine für 20 Min. im Dunkeln alkylierten. Anschließend wurde die Iodacetamidlösung von den Gelstücken entfernt und die Proben wurden dreimal mit 200 µl ABC-Puffer für je 10 Min. auf dem Schüttler bei 900 rpm und RT gewaschen. Nach dem Waschschrift wurden die Gelstücke mit 160 µl ACN auf dem Schüttler bei 20°C und 900 rpm für 5 Min. dehydratisiert. Die Flüssigkeit wurde vollständig abgenommen und in der "Speedvak" (Concentrator 5301) 10 Min. bei RT eingedampft.

Verdaut wurden die Proteine mit einer Trypsin-Gold-Arbeitslösung (Promega Corporation, Madison, USA). Hierfür wurde ein 10 µl Trypsin-Aliquot (100 ng/µl) mit 190 µl ABC-Puffer verdünnt, jeweils 40 µl dieser Lösung wurden zu den Banden pipettiert und der Ansatz für 5 Min. auf Eis gestellt. Nach dem Aufquellen der Gelstücke, wurde die restliche Flüssigkeit abpipettiert. Zuletzt wurden die Gelstücke mit 100 µl ABC-Puffer überschichtet und der Ansatz wurde über Nacht bei 37°C inkubiert.

Der Verdau wurde am nächsten Tag durch Zugabe von 100 µl 10% TFA gestoppt. Die Peptide wurden durch 10-minütige Sonifikation im Ultraschallbad (Ultrasonic Cleaner SC100T) aus dem Gel extrahiert. Die Flüssigkeit ohne Gelstücke wurde in ein neues PCR-Reaktionsgefäß überführt und die Sonifikation mit 20 µl 0,1% TFA wiederholt. Die Peptid-Extrakte wurden in einem PCR-Reaktionsgefäß vereinigt und im Gefrierschrank bei -80°C gelagert.

## 2.16.2 Identifizierung der Proteine durch Massenspektrometrie

Die massenspektrometrische Messung wurde am Institut für Biochemie und Molekulare Zellbiologie der Universität Wien (Vienna Biocenter) mit einem LTQ Orbitrap Velos Massenspektrometer (Thermo Scientific, USA) durchgeführt.

MS/MS-Spektren wurden von Dr. Peter Pichler (1. Lauf) und Univ. Ass. Dr. Dorothea Anrather (2. Lauf) mit einer Datenbank abgeglichen, welche die Proteinsequenzen von *Simkania negevensis*, *Waddlia chondrophila*, *Parachlamydia acanthamoebae* UV7, *Protochlamydia amoebophila* UWE25 enthielt. Des Weiteren enthielt die Datenbank häufig gefundene Verunreinigungen, wie beispielsweise Keratine und Amöbenproteinsequenzen.

## 2.16.3 Analyse der identifizierten *S. negevensis*-Proteine mittels bioinformatischer Programme

Wie viele der in der MS-Messung gefundenen *S. negevensis*-Proteine mögliche Außenmembranproteine waren, wurde mittels Verwendung bioinformatischer Software bestimmt (Tab. 14).

**Tab. 14: Verwendete bioinformatische Software zur Vorhersage von Außenmembranproteinen**

Bioinformatische Software	Vorhersage von ...	Referenz
<b>SignalP 3.0 und 4.0</b>	Signalpeptiden	(Bendtsen, Nielsen <i>et al.</i> 2004; Petersen, Brunak <i>et al.</i> 2011)
<b>TMHMM 2.0</b> (“TransMembrane prediction using Hidden Markov Models”)	Transmembran- $\alpha$ -Helices	(Krogh, Larsson <i>et al.</i> 2001)
<b>BOMP</b> (en. “ $\beta$ -Barrel Outer Membrane Protein Prediction“)	$\beta$ -barrels	(Berven, Flikka <i>et al.</i> 2004)



<b>LipoP 1.0</b>	Lipoproteinen	(Juncker, Willenbrock <i>et al.</i> 2003)
<b>PSORTdb 2.0</b> (“database of protein subcellular localizations for bacteria”)	Proteinlokalisationen	(Rey, Acab <i>et al.</i> 2005; Yu, Laird <i>et al.</i> 2011)

## 2.17 Stabilitätsexperiment mit *Simkania negevensis*

Die partiell aufgereinigten *Simkania negevensis*-Zellen (2.11) wurden ausgezählt (2.13.2). Es wurde mit einer MOI (*en.* Multiplicity of Infection) von 100 infiziert. Pro 30 µl Ansatz wurden  $5 \cdot 10^6$  Zellen verwendet.

Um das Stabilitätsverhalten zu untersuchen, wurde die gewünschte Anzahl an Zellen abzentrifugiert ( $17949 \times g$ , 4°C, 30 Min.) und in SPG, SPG mit 5 mM Dithiothreitol (DTT),  $ddH_2O$  oder  $ddH_2O$  mit 5 mM DTT resuspendiert. Die Zellen wurden in den Medien über eine bestimmte Zeitspanne (1, 3, 5, 24, 48 Std.) inkubiert. Zusätzlich wurden als eine Nullstunden-Kontrolle (0-Std.-Kontrolle) weitere Zellen mit entsprechender Anzahl wie oben zentrifugiert, das Pellet in 100 µl SPG pro Ansatz resuspendiert und bei -80°C gelagert. Diese Kontrolle diente dazu, die Infektionsrate von uninkubierten EBs zu bestimmen und abhängig von dieser - als Hundertprozentmarke - die relative Infektionsrate der inkubierten EBs abzuleiten. Nach den jeweiligen Zeitpunkten der Inkubationen wurden die Zellen abzentrifugiert ( $17949 \times g$ , 4°C, 30 Min.), in 100 µl SPG pro Ansatz aufgenommen und bei -80°C gelagert.

*Acanthamoeba* sp. UWC1 wurden mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer ausgezählt, indem von einer 1:10-Verdünnung in  $1 \times PBS$  12 µl in die Kammer pipettiert und die Zellen unter einem binären Mikroskop gezählt wurden. Die Zahl der Amöben pro ml wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\frac{\text{Zellen}}{\text{ml}} = \frac{\text{Anzahl der Zellen} * V}{\text{ausgezählte Fläche} * \text{Kammertiefe (mm)}} * 1000$$

V... Verdünnungsfaktor = 10

Kammertiefe = 0,1 mm

Nach der Auszählung wurde die entsprechende Anzahl an Amöbenzellen ( $5 \cdot 10^4$  / ml) in je 24 ml TSY pipettiert. Die Amöbenzellen wurden in 24-Well-Platten mit darin

befindlichen Glasplättchen pipettiert und für 1½ Std. in einen 21°C temperierten Brutschrank gestellt. Nach 1½ Std. wurden die eingefrorenen, ausgezählten EBs im Wasserbad bei 37°C aufgetaut. Die Amöben wurden in den einzelnen Wells mit je 100 µl EBs der verschiedenen Ansätze infiziert. Zusätzlich wurden zwei Amöbenaliquote zur Kontrolle nicht infiziert und zwei Amöbenaliquote mit den EBs der 0-Std.-Kontrolle. Die 24-Well-Platte wurde bei RT und 600 × g für 15 Min. zentrifugiert. Nach dem Zentrifugationsschritt wurde die Platte in einen Brutschrank bei 21°C gegeben und bis auf einen Medienwechsel nach 4½ Std. für exakt vier Tage im 21°C temperierten Brutschrank gelassen.

Nach vier Tagen Inkubation wurden die Zellen mit Methanol fixiert (2.13.4) und mittels Immunfluoreszenzanalyse (2.13.5) analysiert. Für die Immunfluoreszenzanalyse wurden die produzierten Antikörper aus dem Hasen gegen *S. negevensis* EBs verwendet.

Die Infektionsrate wurde bestimmt, indem die Amöbenzellen als infiziert gewertet wurden, wenn innerhalb der Amöbenzelle mehr als zehn *Simkania negevensis*-Zellen entdeckt werden konnten. Die *Simkania negevensis*-Zellen wurden mit den hergestellten Hasen-Antikörpern gegen *S. negevensis* EBs (Tab. 11) detektiert.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Hochaufreinigung von EBs

Die Hochaufreinigung der Elementarkörperchen von *S. negevensis*, *W. chondrophila* und *P. acanthamoebae* wurde mit einem bewährten Protokoll unserer Gruppe für *P. amoebophila* durchgeführt (Sixt, Heinz *et al.* 2011), das auf Protokollen anderer Gruppen für die Aufreinigung von Chlamydien EBs (Caldwell, Kromhout *et al.* 1981; Kahane, Kimmel *et al.* 2002; Li, Vaglenov *et al.* 2005) aufbaut. Diese Methode beruht auf einer Ultrazentrifugation durch einen Dichtegradienten, durch den die dichten EBs hindurch kommen, während Wirtszellbestandteile und Retikularkörperchen im Gradienten hängen bleiben.

Die Hochaufreinigungen der *Parachlamydia acanthamoebae* EBs erzielten die größten Ausbeuten, da hier - anders als bei *Waddlia chondrophila* und *Simkania negevensis* – aufgrund des kürzeren Entwicklungszyklus mehr Biomasse eingesetzt werden konnte.

##### 3.1.1 Hochaufreinigung von *Simkania negevensis* EBs mittels verschiedener Dichtegradienten

Da die Ausbeute der Hochaufreinigung von *Simkania negevensis* EBs gering war, wurden wie im 2.10 beschriebenen Protokoll auch andere Konzentrationen des Gastrografin-Gradienten getestet, um den besten Gradienten für die Hochaufreinigung der *Simkania negevensis* EBs zu finden. Überprüft wurde dies mittels DAPI- und DIOC<sub>6</sub>-Färbung sowie anschließender Epifluoreszenzmikroskopie (2.12.8). Der erste Gradient blieb in der Zusammensetzung unverändert: 50%-Saccharose überschichtet mit 30%-Gastrografin. Bei diesem Schritt sollte ein Großteil der Amöbentrümmer und nicht intakten EBs entfernt werden, zumal zuvor ein Zentrifugationsschritt mit 30%-Gastrografin durchgeführt wurde. Der zweite Dichtegradient wurde entweder mit 30% und 34%, 34% und 40%, oder mit 40% und 46% Gastrografinkonzentration getestet.

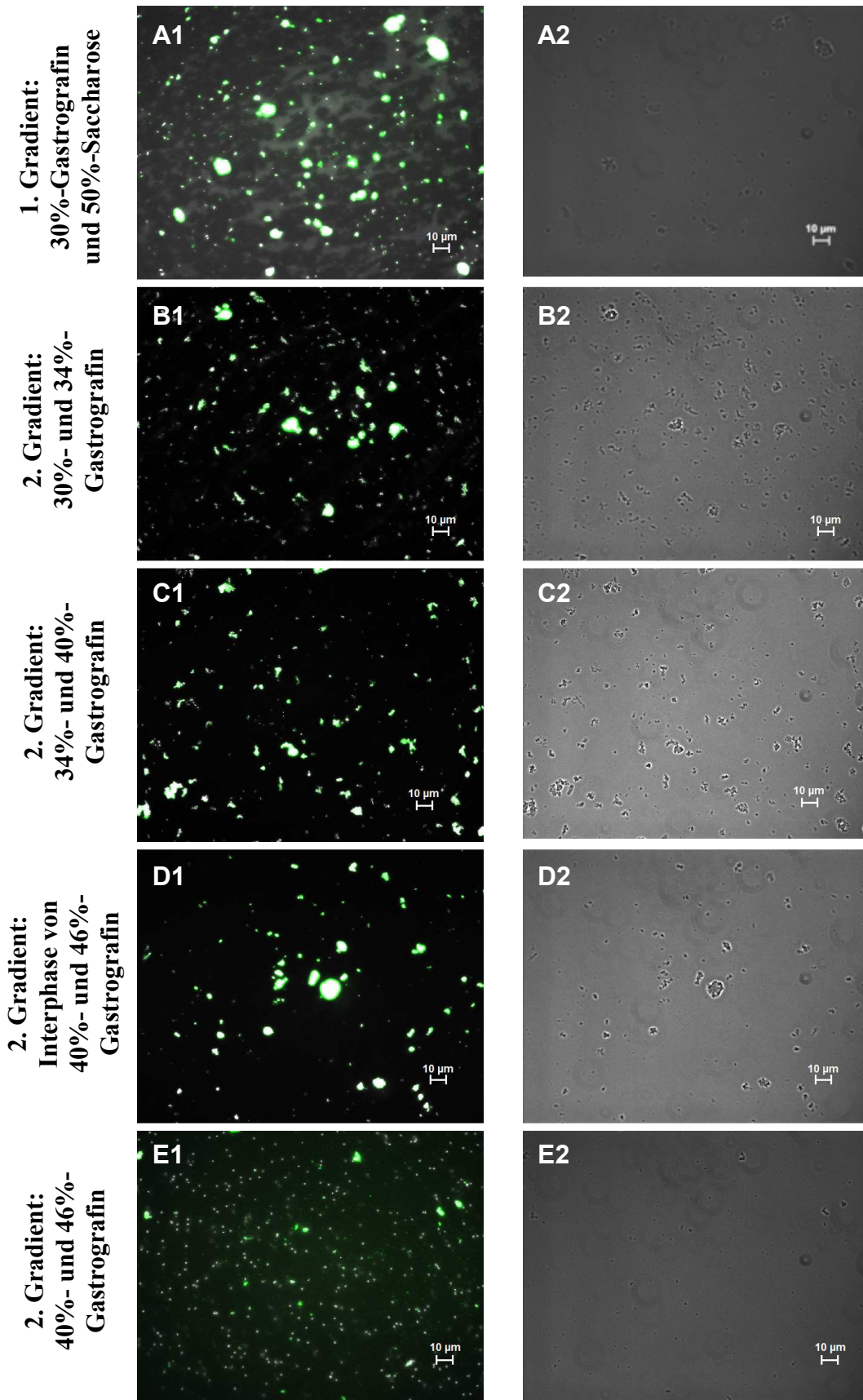


Abb. 7: Epifluoreszenzmikroskopieaufnahmen der mit unterschiedlichen Dichtegradienten hochaufgereinigten *Simkania negevensis* EBs. Links jeweils ein Epifluoreszenzbild (A1-E1) einer Bildüberlagerung mit DAPI-Signal in weiß und DIOC<sub>6</sub>-Signal in grün; rechts je ein Differentialinterferenzkontrastbild (A2-E2). A-D: 1:30 Verdünnung; E: 1:10 Verdünnung. Maßstab: 10 µm

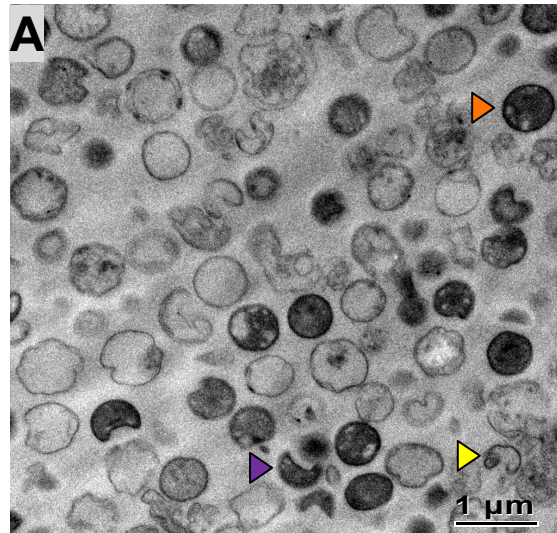
Die EB-Suspension zeigte nach der Hochaufreinigung mit dem ersten Gradienten (30%-Gastrografin und 50%-Saccharose) deutlich durch DIOC grün-gefärbte Verunreinigungen durch Amöbenzelltrümmer mit bis zu 15 µm Durchmesser (Abb. 7, A1). Diese Zelltrümmer der Amöben sind ebenso im Differentialinterferenzkontrastbild zu erkennen (Abb. 7, A2). Die Hochaufreinigung der *S. negevensis* EBs mit einem zusätzlichen zweiten Gradienten mit 40%- und 46%-Gastrografin erwies sich als beste Lösung für eine Hochaufreinigung mit wenig Verunreinigungen (Abb. 7, E1 und E2). Man kann nur sehr wenige größere Signale in grün erkennen und viele EBs in weiß (Abb. 7, E1). Im Gegensatz dazu sind mehr Amöbenzelltrümmer in den weniger stringenten zweiten Gradienten zu beobachten (Abb. 7, B1 und C1), die dem Verunreinigungsgrad nach der Hochaufreinigung mit dem ersten Gradienten ähnelten (Abb. 7, A1). Die Interphase nach der zweiten Hochaufreinigung mit 40%- und 46%-Gastrografin (Abb. 7, D1) enthielt erhebliche Verunreinigungen und wenige EBs.

Diese Ergebnisse zeigten, dass bei einer Hochaufreinigung von *Simkania negevensis* EBs - für eine möglichst reine und trotzdem noch hohe EB-Asubeute - ein zweiter Dichtegradient von 40%- und 46%-Gastrografin zu präferieren ist. Daher wurde für alle Hochaufreinigungen von *S. negevensis* EBs dieser Gradient verwendet.

### **3.1.2 Überprüfung der Hochaufreinigung von EBs durch Transmissionselektronenmikroskopie**

Da es am Epifluoreszenzmikroskop nicht möglich ist zwischen EBs und RBs zu differenzieren (Abb. 7), wurde ein Teil der hochaufgereinigten EB-Suspensionen mittels Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) analysiert. Die Elektronenmikroskopbilder geben zudem einen genaueren Einblick in den Grad der Verunreinigung durch Wirtszellbestandteile. Die Fixierung für TEM wurde direkt nach der Hochaufreinigung für *Parachlamydia acanthamoebae* und *Waddlia chondrophila* EBs laut 2.12.9.1 und für *Simkania negevensis* EBs laut 2.12.9.2 durchgeführt.

*Parachlamydia acanthamoebae*

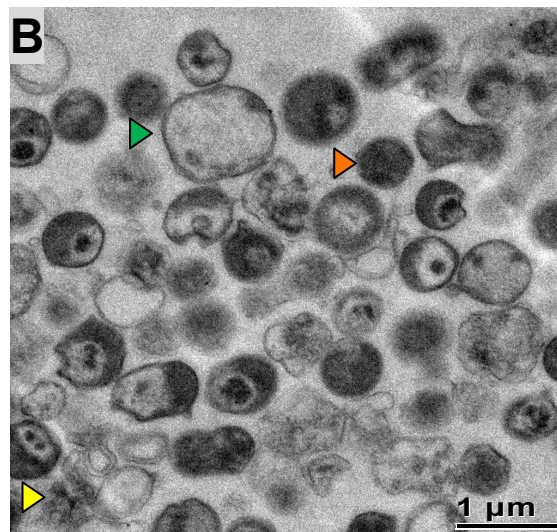


▶ EB

▶ CB

Verunreinigung  
durch lysierte  
Amöben- und  
Chlamydienzellen

*Waddlia chondrophila*

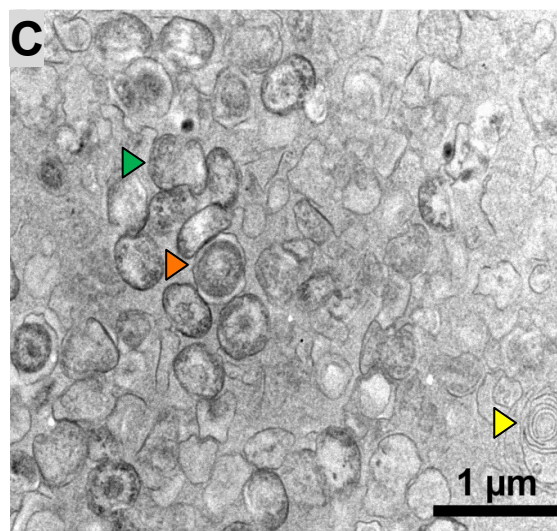


▶ EB

▶ RB

Verunreinigung  
durch lysierte  
Amöben- und  
Chlamydienzellen

*Simkania negevensis*



▶ EB

▶ RB

Verunreinigung  
durch lysierte  
Amöben- und  
Chlamydienzellen

**Abb. 8:** Elektronenmikroskopische Aufnahme der hochaufgereinigten Elementarkörperchen von *Parachlamydia acanthamoebae* UV7 (A), *Waddlia chondrophila* (B) und *Simkania negevensis* (C). Bild C wurde in Kontrast und Helligkeit bearbeitet. Bild A und B wurden von Rok Kostanjsek 2011 und Bild C von Lena König aufgenommen. Ein jeweils elektronendichtes, rundes EB, ein RB bzw. ein CB ("crescent body") und eine Verunreinigung durch lysierte Amöben- und Chlamydienzellen sind repräsentativ mit einem farbigen Pfeilkopf markiert. Maßstab: 1 µm.



Bei den TEM-Aufnahmen von *P. acanthamoebae* kann man neben EBs auch halbmondförmige Strukturen (en. crescent bodies - CB) erkennen (Abb. 8, A). Deutliche RBs sind bei *P. acanthamoebae* nicht zu erkennen. Teilweise kann man in den EBs die kondensierte DNS erkennen, was vor allem bei den *Waddlia chondrophila* EBs (Abb. 8, B) sehr deutlich zu sehen ist. Verunreinigungen durch lysierte Chlamydien- bzw. Amöbenzellen treten als strukturlose Zellbestandteile auf. Vergleicht man die drei TEM-Aufnahmen hinsichtlich der Verunreinigungen, kann man feststellen, dass diese gering ausgefallen sind, wobei bei *Waddlia* auch in den anderen TEM-Bildern (nicht gezeigt) etwas mehr zu sehen ist. Eine eindeutige Aussage bei *S. negevensis* ist etwas schwieriger, da hier die EBs eng zusammen liegen. Erwähnenswert ist zudem die Tatsache, dass - in Rücksprache mit Ass. Prof. Kostanjsek - bei *W. chondrophila* weniger EBs auffindbar waren.

Alles in allem bestätigten die TEM-Bilder der jeweiligen Umweltchlamydien EBs, dass die Hochaufreinigungen erfolgreich waren, d.h. der Grad der Verunreinigung durch Amöbenzellteile gering ausfiel und EBs angereichert wurden.

### 3.1.3 Screening von hochaufgereinigten EBs

Nach jeder Hochaufreinigung wurde aus den EBs DNS isoliert und mittels PCR die 16S rRNS-Gene amplifiziert. Eine erfolgreiche Amplifizierung der 16S rRNS-Gene aus der isolierten DNS von hochaufgereinigten *S. negevensis*, *W. chondrophila* und *P. acanthamoebae* EBs konnte durch eine Agarose-Gelelektrophorese bestätigt werden. Ein Restriktionsverdau und eine letztliche Sequenzierung der 16S rRNS-Gene zeigten, dass es bei den drei Umweltchlamydien zu keiner Verunreinigung durch Kontaminationen mit anderen Chlamydien kam.

### 3.2 Antikörper gegen Außenmembranproteine von hochaufgereinigten EBs

#### 3.2.1 Präimmunserentest

Der Präimmunserentest diente dazu, die geeignetsten Tiere aus jeweils zehn Meerschweinchen und Hasen für die Antikörperproduktion zu finden. Es wurden pro Chlamydien-Spezies je zwei Meerschweinchen und ein Hase ausgewählt. Das Präimmunserum wurde mittels Immunfluoreszenz- und Westernblotanalyse (2.13) getestet. Hierfür wurden sowohl bakterienfreie *Acanthamoeba* sp. UWC1 als auch *Acanthamoeba* sp. UWC1 mit den jeweiligen Symbionten getestet. Bei keinem der Präimmunseren kam es zu einem deutlichen Immunfluoreszenzsignal (Daten nicht gezeigt). Man konnte demnach eine vorausgegangene Immunisierung der Tiere mit Amöben und/oder Umweltchlamydien ausschließen.

#### 3.2.2 Immunfluoreszenzanalyse mit Antikörpern gegen Außenmembranproteine von hochaufgereinigten EBs

Immunfluoreszenzanalysen mit den produzierten Antikörpern wurden nach der ersten, der zweiten und der finalen Blutentnahme durchgeführt. Zusätzlich wurde ein weiterer Antikörper (anti-DnaK) verwendet, der ein Hitzeschockprotein im Cytosol der Chlamydien bindet. Die Antikörper der jeweiligen Tiere zeigten ein starkes Immunfluoreszenzsignal gegen *S. negvensis* und *P. acanthamoebae* (Tab. 15; Abb. 9). Im Gegensatz dazu zeigten die produzierten Antikörper der Meerschweinchen, die an *W. chondrophila* hätten binden sollen, kein Immunfluoreszenzsignal und die des Hasen nur ein schwaches Fluoreszenzsignal gegen *W. chondrophila* (Tab. 15; Abb. 9). Ein starkes Immunfluoreszenzsignal war jedoch für die Amöben erkennbar. Dieses Ergebnis zeichnete sich bereits nach der ersten Blutentnahme ab.

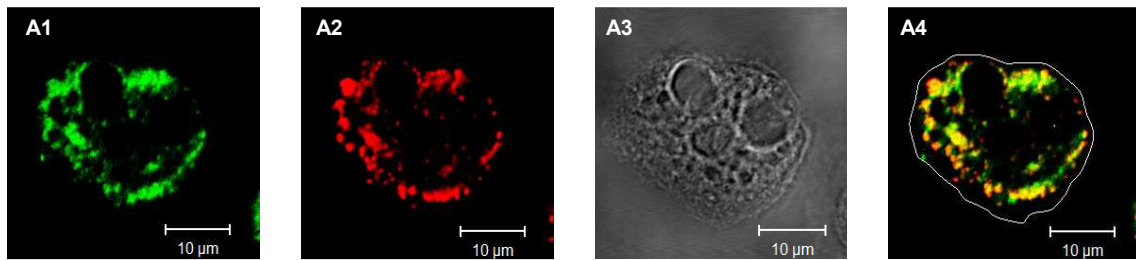
Tab. 15: Antikörpertest nach der finalen Blutentnahme durch Immunfluoreszenzanalyse

Antikörper aus	Verwendeter Antikörper		
	anti-Sn	anti-Pa	anti-Wc
Hase	+	+	+/-
Meerschweinchen 1	+	+	-
Meerschweinchen 2	+	+	-

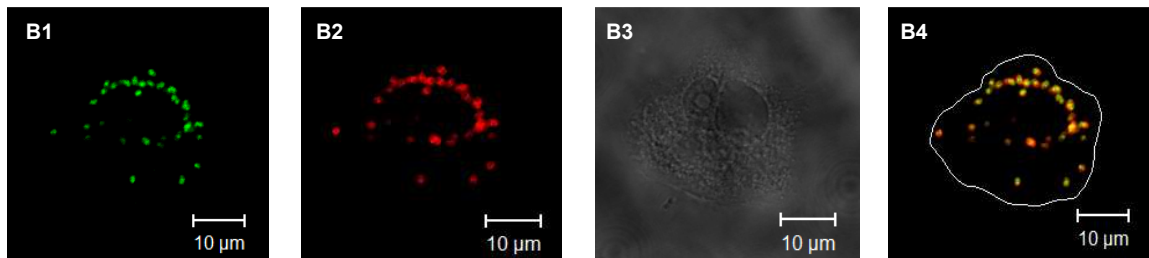
(+) Immunfluoreszenzsignal; (-) kein Immunfluoreszenzsignal; (+/-) schwaches Immunfluoreszenzsignal



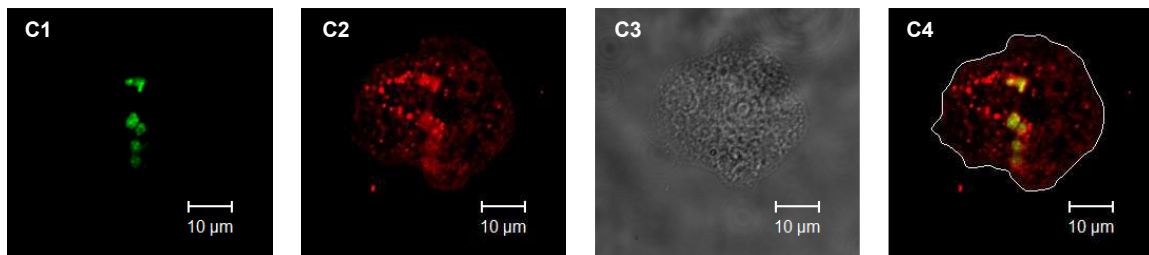
*Acanthamoeba* sp. UWC1 mit *Simkania negevensis*



*Acanthamoeba* sp. UWC1 mit *Parachlamydia acanthamoebae* UV7



*Acanthamoeba* sp. UWC1 mit *Waddlia chondrophila*

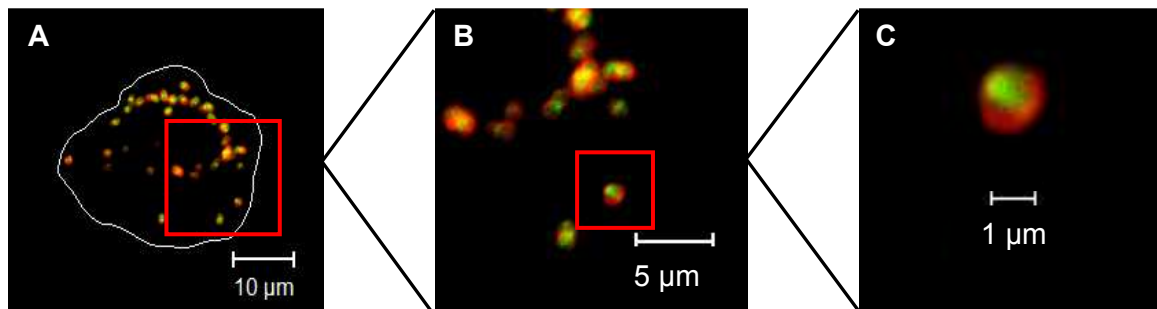


**Abb. 9: Detektion von *S. negevensis*- (A), *P. acanthamoebae*- (B) und *W. chondrophila* (C) in infizierten *Acanthamoeba* sp. UWC1-Zellen.** Zu sehen sind verschiedene *Acanthamoeba* sp. UWC1-Trophoziten, die mit den jeweiligen Symbionten infiziert sind. Die Bilder links zeigen in grün das Signal mit dem anti-DnaK-Antikörper für die Symbionten (1), mittig links in rot das Signal für die Symbionten mit dem jeweiligen Antikörper gegen die EBs (2), mittig rechts ein Differentialinterferenzkontrastbild (DIC) der Amöbenzelle und rechts eine Überlagerung der Cy2- und Cy3-Kanäle (gelb, resultierend aus der Überlagerung von rot und grün) mit einer Kontur der Amöbenzelle in weiß. Maßstab: 10 µm.

Aus den Bildern C1 bis C4 aus Abbildung 9 wird deutlich, dass die Antikörper des Hasen nur schwach gegen die *W. chondrophila* EBs, jedoch stark gegen Bestandteile der Amöbenzelle reagieren, obwohl die Antikörper zuvor gegen Amöbenzellmaterial inaktiviert wurden (2.13.3). Das Vorhandensein von *W. chondrophila*-Zellen konnte mit dem anti-DnaK-Antikörper bestätigt werden. Dieses Ergebnis zeigte sich bei den anti-Wc-Antikörpern der Meerschweinchen ebenso (vgl. Abb. 11, A).

Bei der mit *S. negevensis* (Abb. 9, A2) und mit *P. acanthamoebae* UV7 (Abb. 9, B2) infizierten Amöbenzelle konnte man ein deutliches Immunfluoreszenzsignal der Antikörper gegen die jeweiligen Chlamydien erkennen. In Abbildung 10 kann man am Beispiel von *P. acanthamoebae* zudem sehr deutlich sehen, dass das Signal nur außen an der Zelle erscheint (rot) und das Signal des anti-DnaK-Antikörpers nur im Inneren der

Zelle zu erkennen ist (grün), da dieser gegen das cytosolische Hitzeschockprotein Hsp60 bindet.



**Abb. 10:** Vergrößerung der Immunfluoreszenzmikroskopieaufnahme einer mit *P. acanthamoebae* infizierten *Acanthamoeba* sp. UWC1-Zelle. Die Bilder zeigen eine Überlagerung des Cy2- und Cy3-Kanals, wobei Signale für den anti-DnaK-Antikörper in grün und den anti-Pa-Antikörper in rot aufscheinen. Bild A zeigt eine infizierte *Acanthamoeba* sp. UWC1-Trophozit (weiße Kontur), Bild B eine Vergrößerung mehrerer EBs aus Bild A und Bild C eine Vergrößerung eines Bakteriums aus Bild B.

### 3.2.3 Test auf Kreuzreaktion der Antikörper

Der Kreuzreaktionstest diente dazu, herauszufinden, wie spezifisch die produzierten Antikörper gegen die jeweiligen Umweltchlamydien sind. Hierfür wurde eine Immunfluoreszenzanalyse (2.13.5) aller hergestellten Antikörper an kontinuierlichen Kulturen von *S. negevensis*, *P. acanthamoebae* und *W. chondrophila* einzeln durchgeführt. Bei allen Immunfluoreszenzanalysen wurde zusätzlich der anti-DnaK-Antikörper verwendet, um Chlamydien in den Amöben zu detektieren, auch wenn kein Signal der Außenmembran-Antikörper auftrat. Aus Tabelle 16 geht hervor, dass die gegen *P. acanthamoebae* und *W. chondrophila* hergestellten Antikörper keine Kreuzreaktion mit *S. negevensis* zeigen.

**Tab. 16:** Kreuzreaktionstest der produzierten Antikörper aus der finalen Blutentnahme mittels Immunfluoreszenzanalyse

Getestete Chlamydien EBs	Verwendeter Antikörper								
	anti-Sn			anti-Pa			anti-Wc		
	H	M1	M2	H	M1	M2	H	M1	M2
<i>S. negevensis</i>	+	+	+	-	-	-	-	-	-
<i>P. acanthamoebae</i>	-	-	-	+	+	+	+/-	+/-	+/-
<i>W. chondrophila</i>	-	-	-	-	-	+/-	+/-	-	-

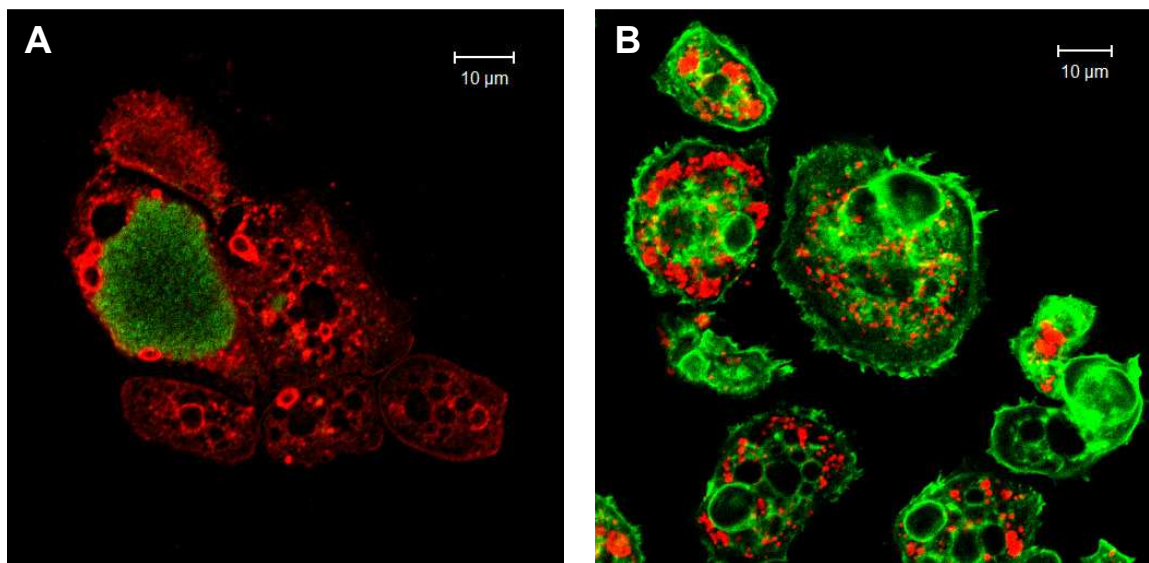
(H) Hase; (M1) Meerschweinchen 1; (M2) Meerschweinchen 2

(+) Immunfluoreszenzsignal; (-) kein Immunfluoreszenzsignal; (+/-) schwaches Immunfluoreszenzsignal

## Ergebnisse

Die Antikörper aller drei Tiere gegen *W. chondrophila* EBs führten zu einem schwachen Signal bei *P. acanthamoebae*, wobei es hier schwierig ist, zu differenzieren, da - wie in 3.2.2 bereits erwähnt - ein starkes Immunfluoreszenzsignal von der Amöbe ausging. Der anti-Pa-Antikörper von Meerschweinchen 2 ergab ein schwaches Immunfluoreszenzsignal bei *W. chondrophila*.

Da die anti-Wc-Antikörper starke Signale gegen die Amöben auslösten, konnte man diese auch als Antikörper gegen Amöben verwenden. In Abbildung 11, Bild B kann man sehen, dass *S. negevensis* keine Kreuzreaktion mit den anti-„Amöben“-Antikörpern (anti-Wc) in grün zeigt, da *S. negevensis* nur das rote Signal des anti-Sn-Antikörpers aufweist.



**Abb. 11: Immunfluoreszenzmikroskopieaufnahmen mit anti-Wc-Antikörpern, die an Zellbestandteile der Amöben, aber nicht an *W. chondrophila*- oder *S. negevensis*-Zellen binden.** Zu sehen sind zwei Bilder einer Überlagerung der Cy2- und Cy3-Kanäle von *Acanthamoeba* sp. UWC1-Trophoziten, die mit *W. chondrophila*- (A) und *S. negevensis* (B) infiziert sind. Signale für die *W. chondrophila*-Zellen in grün mit dem anti-DnaK-Antikörper und die *Acanthamoeba*-Trophoziten in rot mit dem Antikörper gegen *W. chondrophila* aus Meerschweinchen 2 (links). Rechts: Signale für *S. negevensis*-Zellen in rot mit dem anti-DnaK-Antikörper und die *Acanthamoeba*-Trophoziten in grün mit dem anti-Wc-Antikörper aus Meerschweinchen 2. Maßstab: 10 µm.

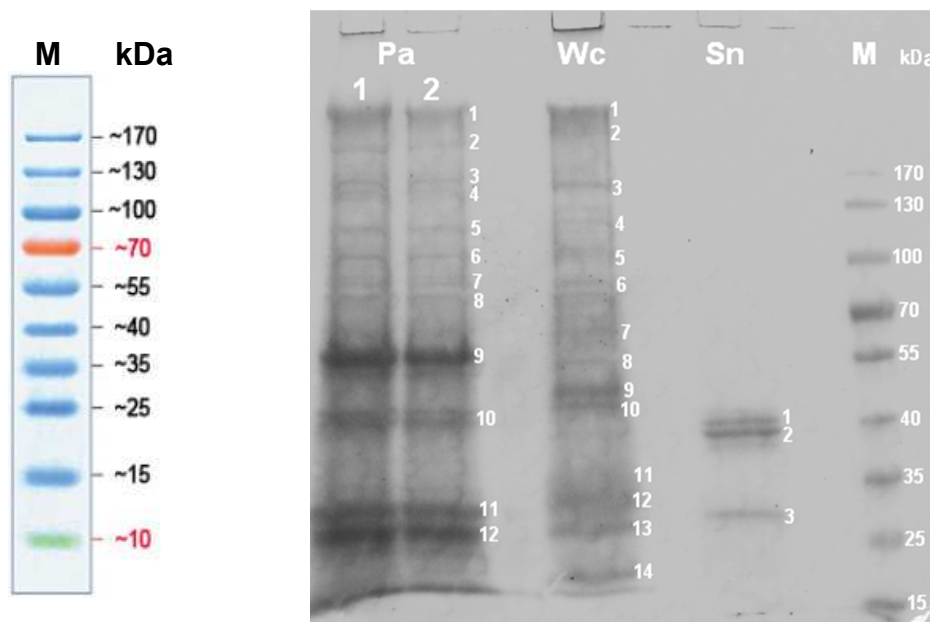
### 3.3 Außenmembranproteine von Umweltchlamydien EBs

#### 3.3.1 Analyse der Extraktionsmethoden von Außenmembranproteinen mittels SDS-PAGE

Der Vergleich der Extraktionsmethoden bezieht sich zumeist auf die Außenmembranproteine von *Simkania negevensis* und *Parachlamydia acanthamoebae*, da für diese beiden Organismen am meisten Biomasse zur Verfügung stand. Die Außenmembranproteine wurden aus den hochaufgereinigten EBs extrahiert und anschließend mittels SDS-PAGE getrennt und verglichen.

##### 3.3.1.1 Extraktion der Außenmembranproteine aus hochaufgereinigten EBs durch Sarkosyl

Die wohl meist verwendete Methode zur Extraktion von Außenmembranproteinen bei Chlamydien ist die Behandlung der Proteine mit dem anionischen Detergens N-Lauroylsarcosin. Hier bleibt die äußere Membran intakt, während die innere Membran in Lösung geht (Arnold und Linke 2008; Caldwell, Kromhout *et al.* 1981).



**Abb. 12: SDS-PAGE der Außenmembranproteinfraktionen der drei untersuchten Umweltchlamydien nach Extraktion mit Sarkosyl.** Die Auftrennung erfolgte durch ein selbstgegossenes 12,5%-iges SDS-Polyacrylamidgel. M: Marker in Kilodalton (kDa); Pa: Außenmembranproteinfraktion von *P. acanthamoebae* (2 Replikate, 1 und 2); Wc: Außenmembranproteinfraktion von *W. chondrophila*; Sn: Außenmembranproteinfraktion von *S. negevensis*. Die nummerierten Banden der Außenmembranproteine wurden für spätere massenspektrometrische Analysen ausgeschnitten und bei -80°C gelagert.

In Abbildung 12 kann man erhebliche Unterschiede in den Bandenmustern der drei untersuchten Umweltchlamydien erkennen. Während *P. acanthamoebae* und *W. chondrophila* ein komplexes Bandenmuster aufweisen, sind bei *S. negevensis* nur drei deutliche Banden erkennbar. Die bei 40 Kilodalton aufscheinenden Banden 1 und 2 von *S. negevensis* könnten das MOMP und die MOMP-ähnliche Proteine beinhalten. Die starke Bande 9 bei 60 kDa von *P. acanthamoebae* könnte auf OmcB hinweisen, das bei *Chlamydiaceae* häufig vorkommt (Liu, Afrane *et al.* 2010) und im Genom von *S. negevensis* nicht vorhanden ist (Collingro, Tischler *et al.* 2011). Im Gegensatz zur starken Bande von *P. acanthamoebae* bei 60 kDa findet man bei *W. chondrophila* nur mehrere schwache Banden um 60 kDa, obwohl bei *W. chondrophila* im Genom OmcB vorhergesagt wurde (Collingro, Tischler *et al.* 2011).

### 3.3.1.2 *n*-octyl Polyoxyethylen und Triton X als alternative Extraktionsmethode der Außenmembranproteine aus Umweltchlamydien EBs

Die Außenmembranproteine der mit *n*-octyl Polyoxyethylen (*n*-octyl POE) behandelten EBs von *S. negevensis* und *P. acanthamoebae* wurden zum Vergleich mit dem Bandenmuster nach Sarkosylbehandlung ebenfalls auf ein SDS-Polyacrylamidgel geladen (Abb. 13). *n*-octyl Polyoxyethylen ist ein nichtionisches Detergens, das die Außenmembranproteine in Lösung bringt (Mahasreshti, Murphy *et al.* 1997).

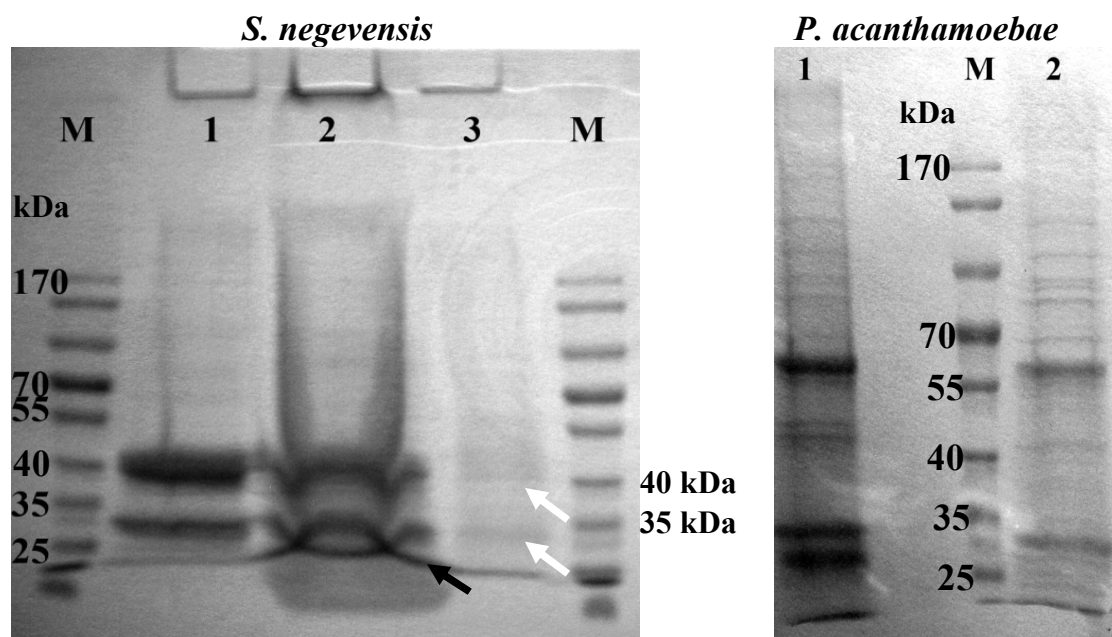


Abb. 13: SDS-PAGE der Außenmembranproteine von *S. negevensis* und *P. acanthamoebae* nach Extraktion mit Sarkosyl (1), *n*-octyl POE (2) und Triton X-114 (3). M: Marker in kDa. schwarzer Pfeil: Verunreinigung durch Aceton; weiße Pfeile: schwache Banden.

## Ergebnisse

Das Schmieren der Bahn bei der n-octyl POE Behandlung (schwarzer Pfeil) in Bahn 2 ist auf den Verbleib von Aceton zurückzuführen, welches nach den Proteinfällungen nicht vollständig verdampft ist. In Bahn 2 von *S. negevensis* kann man die gleichen Banden wie nach Sarkosyl-Behandlung erkennen. Betrachtet man Bahn 3 (mit Triton X-114 behandelte EBs), kann man nur sehr schwache Banden (weiße Pfeile) sehen. Diese sind wiederum ähnlich zu denen in Bahn 1 und 2 mit der markanten Bande bei 40 kDa. Die sehr schwachen Banden in Bahn 3 sind auf eine erhebliche Erniedrigung der Proteinkonzentration während der Extraktion zurückzuführen. Dies könnte daran liegen, dass bei der Triton X-114-Phasentrennung die Proteine in einem zu großen Volumen aufgenommen worden waren, obwohl nur mit der Hälfte des Ansatzes - wie bei Everett *et al.* beschrieben - gearbeitet wurde (Everett, Desiderio *et al.* 1994).

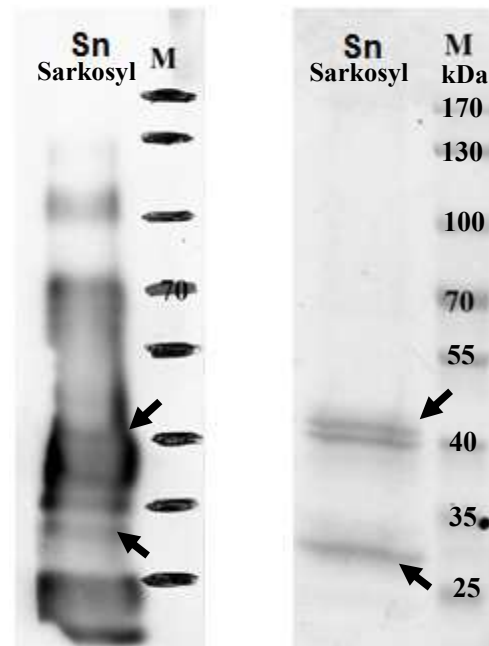
Auffallend bei *P. acanthamoebae* ist, dass zwischen 35 und 25 kDa bei Bahn 2 (n-octyl POE) nur eine dicke Bande zu sehen ist, bei Bahn 1 (Sarkosyl) aber zwei dicke Banden zu erkennen sind. Ebenso verhält es sich im Bereich zwischen 40 und 55 kDa, in dem bei Bahn 2 wiederum nur eine Bande gegenüber zwei Banden bei Bahn 1 aufscheinen. Hier könnte es zu einer Extraktion unterschiedlicher Außenmembranproteine durch die beiden Detergentien gekommen sein.

Der Gesamteindruck der Bandenmuster beider Organismen lässt aber darauf schließen, dass die Behandlung mit den unterschiedlichen Detergentien zu einer ähnlichen Extraktion der Außenmembranproteine führte und somit eine Behandlung mit Sarkosyl zu präferieren wäre, da man hier die größte Proteinausbeute beobachten konnte.

### 3.3.2 Westernblotanalyse mit Außenmembranproteinfraktionen von *S. negevensis* nach Extraktion mit Sarkosyl

Die Analyse der extrahierten Außenmembranproteine von *S. negevensis* mittels Westernblot ist sensitiver als durch eine SDS-PAGE und zeigt immunogene Außenmembranproteine. Für den Westernblot wurden die gegen Außenmembranproteine von *S. negevensis* EBs hergestellten Antikörper verwendet. Bei dem SDS-Polyacrylamidgel in Abbildung 14 kann man - wie bereits in anderen Gelen gezeigt - nur drei deutliche Banden erkennen. Das Bandenmuster des Westernblots hingegen ist komplexer, wobei die am Proteingel sichtbaren Banden (schwarze Pfeile) im Westernblot ebenso zu sehen sind.

Der sensitivere Westernblot wies darauf hin, dass die gesamte Proteinbahn aus dem SDS-Polyacrylamidgel und nicht nur einzelne Banden durch Massenspektrometrie (MS) analysiert werden sollten, um alle im Gel vorhandenen Außenmembranproteine zu detektieren.



**Abb. 14: Westernblot (links) und SDS-PAGE (rechts) mit Außenmembranproteinfraktionen von *S. negevensis* nach Extraktion mit Sarkosyl.** M: Marker in kDa. Verwendete Antikörper (AK): 1. AK: anti-Sn aus Hase, 2. AK: HRP anti-Hase IgG. Reaktionszeit: 3 Sek.

### 3.3.3 Identifikation von Außenmembranproteinen von *S. negevensis* durch Massenspektrometrie

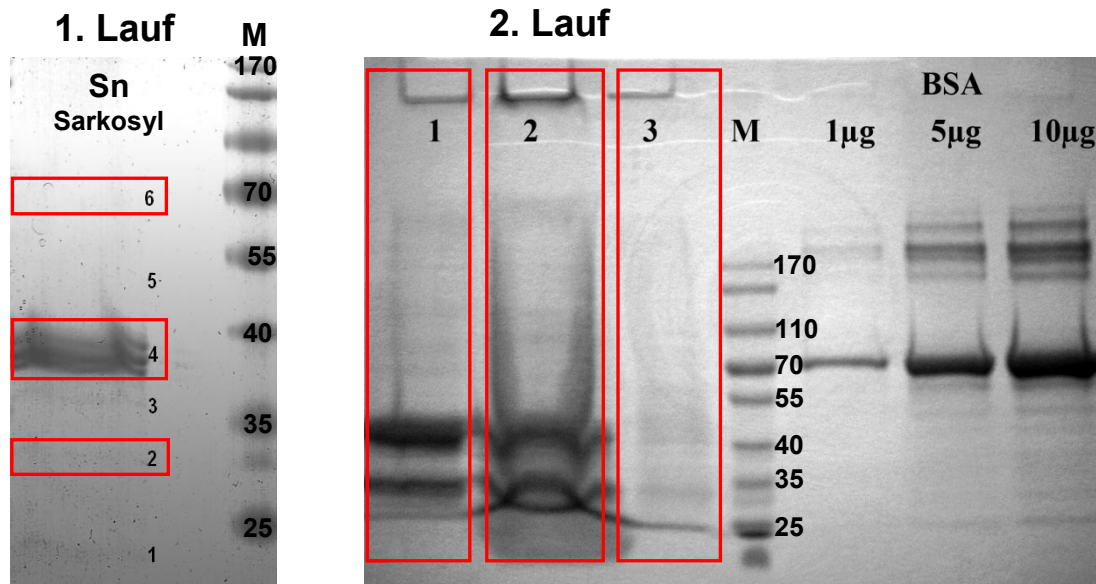
Proteine in den Außenmembranproteinfraktionen von *S. negevensis* wurden durch Messungen mit einer LTQ Orbitrap Velos (Thermo Fisher Scientific, USA) am Department für Biochemie und Zellbiologie der Universität Wien von Dr. Dorothea Anrather und Dr. Peter Pichler massenspektrometrisch identifiziert.

Aus den hochaufgereinigten *S. negevensis* EBs wurden für die 1. massenspektrometrische Analyse (1. Lauf) die Außenmembranproteine mit Sarkosyl extrahiert und durch ein selbstgegossenes SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt (Abb. 15, links). Für die erste Messung wurden drei Banden bzw. Gelstücke [rot umrandet: 2, 4, 6] aus dem Gel ausgeschnitten und die Proteine aus diesen Banden mit Trypsin verdaut.



## Ergebnisse

Bei einem unabhängigen 2. Lauf (Abb. 15, rechts) wurden die mit Sarkosyl, n-octyl POE und Triton X-114 extrahierten Proteine von *S. negevensis* EBs auf ein 10%-iges Mini-Protean TGX Precast SDS-Polyacrylamidgel (Bio-Rad Laboratories GmbH, München) geladen. Hier wurden die gesamten Bahnen [rot umrandet: 1, 2, 3] ausgeschnitten, die darin befindlichen Proteine mit Trypsin verdaut und massenspektrometrisch analysiert.



**Abb. 15: SDS-PAGE der Außenmembranproteine von *S. negevensis* (Sn) EBs nach Extraktion mit Sarkosyl (1. Lauf und 2. Lauf, Bahn 1), n-octyl POE (2. Lauf, Bahn 2) und Triton X-114 (2. Lauf, Bahn 3).** Die Auftrennung erfolgte durch ein selbstgegossenes 12,5%-iges (links) und ein 10%-iges Mini-Protean TGX Precast SDS-Polyacrylamidgel (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D) (rechts). Die ausgeschnittenen Banden des 1. Laufs sind mit den Zahlen 1 - 6 markiert; M: Marker in Kilodalton (kDa); BSA: Bovines Serumalbumin mit verschiedenen Konzentrationen (1, 5 und 10 µg).

Um die Proteinkonzentrationen der extrahierten Außenmembranproteine abzuschätzen wurden zum Vergleich unterschiedliche Mengen an Bovinem Serumalbumin (BSA) (1, 5 und 10 µg) auf das Geld geladen (Abb. 15, 2. Lauf, rechts). Die Molekülmasse des BSA beträgt 66 kDa und eine Bande für BSA ist im Gel bei ca. 70 kDa deutlich zu sehen. Die zusätzlichen schwächeren Banden entstehen durch Aggregate von BSA (Brahma, Mandal *et al.* 2005), die bei der Abschätzung der Konzentration keine Rolle spielen.

In Tabelle 17 ist eine Gesamtübersicht aller Proteine aus beiden Läufen gezeigt, die mit zwei oder mehr Peptiden in der Datenbank gefunden wurden. Vergleicht man den 1. und den 2. Lauf kann man erkennen, dass im 2. Lauf in allen drei unterschiedlichen Durchgängen erheblich mehr Proteine gefunden wurden, als im 1. Lauf. Ebenso kann man auf den ersten Blick erkennen, dass die prozentualen Anteile der Kontaminationen im 2. Lauf - bis auf Triton X - geringer ausfallen. Dieser Umstand ist durch das



## Ergebnisse

Verwenden eines gekauften SDS-Polyacrylamidgels zu erklären, da hier mögliche Kontaminationen mit Keratinen in Chemikalien zur Gelherstellung entfallen.

**Tab. 17: Gesamtübersicht der durch MS identifizierten Proteine aus dem 1. und 2. Lauf.** POE steht für n-octyl Polyoxyethylen

Gefundene Proteine mit $\geq 2$ Peptiden	1. Lauf	2. Lauf		
	Sarkosyl A (Bande 2, 4 und 6)	Sarkosyl B	POE	Triton X
Gesamte Proteine	55	420	687	815
Chlamydienproteine	28	319	523	411
Kontaminationen (Amöbenproteine, Keratine)	27	101	164	404
Kontaminanten in %	49	24	23	49

Vergleicht man die unterschiedlichen Extraktionsverfahren des 2. Laufs (Tab. 17), wurden trotz der schwachen Banden der mit Triton X-114 extrahierten Proteine im SDS-Gel (Abb. 15) um 92 Chlamydienproteine mehr als nach Sarkosylextraktion detektiert, wobei die Zahl der möglichen Außenmembranproteine geringer ausfiel (Tab. 18).

Die Extraktion der mit Sarkosyl und n-octyl Polyoxyethylen (POE) aufgereinigten Proteine führte - im Verhältnis zur Menge der identifizierten Chlamydienproteine - zu einer geringeren Kontamination (unter 25%) durch *Acanthamoeba* sp. UWC1- und *Homo sapiens*-Proteine (Keratine) als bei der Triton X-114 (49%) Behandlungsmethode.

Mittels bioinformatischer Analyse wurden mögliche Außenmembranproteine von *S. negevensis* in den einzelnen Messungen und im gesamten Genom identifiziert und verglichen (Tab. 18). Hinweise auf ein Außenmembranprotein konnten gemacht werden, wenn durch die bioinformatischen Programme (Tab. 14) SignalP 3, SignalP 4 und Lipop Signalpeptide vorausgesagt wurden, durch TMHMM keine  $\alpha$ -Helix, durch BOMP ein  $\beta$ -Barrel und zuletzt durch PSORTdb ein Außenmembranprotein. Vergleicht man die Zahlen der durch SignalP 4 gefundenen Proteine mit Signalpeptid mit jener Anzahl der im gesamten Genom (171) gefundenen, kann man erkennen, dass in allen Bahnen des 2. Laufs fast oder mehr als ein Drittel aller *S. negevensis*-Proteine mit vorhergesagtem Signalpeptid identifiziert wurden. Ein erheblicher Anteil der gefundenen Chlamydienproteine stellte sich jedoch als wahrscheinlich nicht in der Außenmembran lokalisiert heraus. Bei Sarkosyl B sind beispielsweise insgesamt 319 Chlamydienproteine

## Ergebnisse

gefunden worden, aber nur 62 davon mit Signalpeptid (laut SignalP 4). Von den 27 *S. negevensis*-Proteinen des 1. Laufs hatten 18 laut SignalP 4 ein Signalpeptid (67%). Der Vergleich der mit PSORTdb durchgeführten Analyse des Genoms mit den Sarkosyl B und POE behandelten Proteinen zeigte, dass man 19 der nur 27 insgesamt vorhergesagten Außenmembranproteine gefunden hat.

**Tab. 18: Gesamtübersicht der durch die bioinformatische Software vorhergesagten Außenmembranproteine von *S. negevensis* aus dem 1. und 2. Lauf. Die Auswertung des 2. Laufs wurde hier durch Karin Aistleitner durchgeführt.**

	Proteine	SignalP 3	SignalP 4	TMHMM ( $\alpha$ -helix)	BOMP ( $\beta$ -barrel)	LipoP	PSORTdb
1. Lauf 2. Lauf	Im Genom <sup>1]</sup> vorhergesagt	428	171	386	68	65	27
	Sarkosyl B (319) <sup>2]</sup>	80	62	25	50	21	19
	POE (523) <sup>2]</sup>	117	75	27	53	26	19
	Triton X (411) <sup>2]</sup>	85	51	30	44	23	11
	Bande 2,4,6 (27) <sup>3]</sup>	21	18	0	22	20	5

<sup>1]</sup> gefundene *S. negevensis*-Proteine im Genom

<sup>2]</sup> gefundene *S. negevensis*-Proteine in der MS-Messung des 2. Laufs

<sup>3]</sup> hier wurden alle gefundenen *S. negevensis*-Proteine berücksichtigt, die mehr als 2 Peptide aus allen 3 Banden aufwiesen

Ein Teil der massenspektrometrischen Ergebnisse aus dem 1. und 2. Lauf wird in den Tabellen 19 und 20 angeführt. Hier sind die jeweils zehn *S. negevensis*-Proteine mit den meisten zugeordneten Spektren aufgelistet sind. Die Position der Proteine in der Liste weist auf die Häufigkeit der Proteine in der gesamten MS-Messung hin. Diese Häufigkeit richtet sich nach der Zahl der zugewiesenen Spektren, wobei diese Art von Quantifizierung nur eine relative Abschätzung der Häufigkeit der Proteine erlaubt (Liu, Sadygov *et al.* 2004; Webb-Robertson und Cannon 2007; Zhang, VerBerkmoes *et al.* 2006).

**Tab. 19:** Auszug aus den massenspektrometrischen Ergebnissen des 2. Laufs. Aufgelistet wurden die jeweils zehn häufigsten *S. negevensis*-Proteine, die mit Sarkosyl B (1), n-octyl POE (2) oder Triton X-114 (3) extrahiert wurden.

Gemessene Bahn	Position des Proteins in der Messung	Identifizierte Proteine	Accession number	Molekulargewicht in kDa	Zahl zugewiesener Spektren	Signalpeptid (SignalP 4.0)	Cystein-gehalt in %
<b>1</b> (Sarkosyl B)	1	MOMP-like family protein [ <i>Simkania negevensis</i> Z]	gi 338734236 ref YP_004672709.1	43	994	ja	0,52
<b>1</b> (Sarkosyl B)	2	hypothetical protein SNE_A20110 [ <i>Simkania negevensis</i> Z]	gi 338733906 ref YP_004672379.1	194	759	ja	0,17
<b>1</b> (Sarkosyl B)	3	MOMP-like family protein [ <i>Simkania negevensis</i> Z]	gi 338733966 ref YP_004672439.1	41	713		0
<b>1</b> (Sarkosyl B)	4	MOMP-like family protein [ <i>Simkania negevensis</i> Z]	gi 338734237 ref YP_004672710.1	43	735	ja	0,53
<b>1</b> (Sarkosyl B)	6	MOMP-like family protein [ <i>Simkania negevensis</i> Z]	gi 338733707 ref YP_004672180.1	44	333	ja	0,78
<b>1</b> (Sarkosyl B)	9	MOMP-like family protein [ <i>Simkania negevensis</i> Z]	gi 338732175 ref YP_004670648.1	25	346		0
<b>1</b> (Sarkosyl B)	10	MOMP-like family protein [ <i>Simkania negevensis</i> Z]	gi 338732639 ref YP_004671112.1	45	245		1,01
<b>1</b> (Sarkosyl B)	11	MOMP-like family protein [ <i>Simkania negevensis</i> Z]	gi 338732638 ref YP_004671111.1	42	225	ja	0,80
<b>1</b> (Sarkosyl B)	13	putative outer membrane protein Omp85 [ <i>Simkania negevensis</i> Z]	gi 338732712 ref YP_004671185.1	91	161	ja	0
<b>1</b> (Sarkosyl B)	14	MOMP-like family protein [ <i>Simkania negevensis</i> Z]	gi 338732173 ref YP_004670646.1	45	155	ja	0,26
<b>2</b> (n-octyl POE)	1	MOMP-like family protein [ <i>Simkania negevensis</i> Z]	gi 338734236 ref YP_004672709.1	43	905	ja	0,52
<b>2</b> (n-octyl POE)	2	MOMP-like family protein [ <i>Simkania negevensis</i> Z]	gi 338734237 ref YP_004672710.1	43	733	ja	0,53
<b>2</b> (n-octyl POE)	4	MOMP-like family protein [ <i>Simkania negevensis</i> Z]	gi 338733966 ref YP_004672439.1	41	453		0
<b>2</b> (n-octyl POE)	5	MOMP-like family protein [ <i>Simkania negevensis</i> Z]	gi 338732639 ref YP_004671112.1	45	404		1,01

<b>2</b> (n-octyl POE)	6	MOMP-like family protein [ <i>Simkania negevensis</i> Z]	gi 338732175 ref YP_004670648.1	25	457		0
<b>2</b> (n-octyl POE)	7	MOMP-like family protein [ <i>Simkania negevensis</i> Z]	gi 338733707 ref YP_004672180.1	44	434	ja	0,78
<b>2</b> (n-octyl POE)	8	MOMP-like family protein [ <i>Simkania negevensis</i> Z]	gi 338732173 ref YP_004670646.1	45	217	ja	0,26
<b>2</b> (n-octyl POE)	10	MOMP-like family protein [ <i>Simkania negevensis</i> Z]	gi 338732404 ref YP_004670877.1	47	241	ja	0,48
<b>2</b> (n-octyl POE)	11	putative outer membrane protein Omp85 [ <i>Simkania negevensis</i> Z]	gi 338732712 ref YP_004671185.1	91	251	ja	0
<b>2</b> (n-octyl POE)	13	putative aconitate hydratase 2 [ <i>Simkania negevensis</i> Z]	gi 338733104 ref YP_004671577.1	70	245		0,12
<b>3</b> (TritonX-114)	11	DNA-directed RNA polymerase subunit beta [ <i>S. negevensis</i> Z]	gi 338733406 ref YP_004671879.1	155	45		1,22
<b>3</b> (TritonX-114)	14	DNA-directed RNA polymerase subunit beta [ <i>S. negevensis</i> Z]	gi 338733407 ref YP_004671880.1	141	44		0,64
<b>3</b> (TritonX-114)	17	elongation factor Tu [ <i>Simkania negevensis</i> Z]	gi 338733414 ref YP_004671887.1	43	16		0,76
<b>3</b> (TritonX-114)	19	MOMP-like family protein [ <i>Simkania negevensis</i> Z]	gi 338734236 ref YP_004672709.1	43	11	ja	0,52
<b>3</b> (TritonX-114)	24	hypothetical protein SNE_A20110 [ <i>Simkania negevensis</i> Z]	gi 338733906 ref YP_004672379.1	194	47	ja	0,17
<b>3</b> (TritonX-114)	25	DNA gyrase subunit A [ <i>Simkania negevensis</i> Z]	gi 338733305 ref YP_004671778.1	93	25		0,11
<b>3</b> (TritonX-114)	32	hypothetical protein SNE_A05500 [ <i>Simkania negevensis</i> Z]	gi 338732445 ref YP_004670918.1	49	15		0,22
<b>3</b> (TritonX-114)	35	MOMP-like family protein [ <i>Simkania negevensis</i> Z]	gi 338734237 ref YP_004672710.1	43	13	ja	0,53
<b>3</b> (TritonX-114)	43	MOMP-like family protein [ <i>Simkania negevensis</i> Z]	gi 338732404 ref YP_004670877.1	47	9	ja	0,48
<b>3</b> (TritonX-114)	45	MOMP-like family protein [ <i>Simkania negevensis</i> Z]	gi 338732175 ref YP_004670648.1	25	7		0

**Tab. 20:** Auszug aus den massenspektrometrischen Ergebnissen des 1. Laufs. Aufgelistet wurden die jeweils vier häufigsten *S. negevensis*-Proteine in den Banden 2, 4 und 6, die mit Sarkosyl extrahiert wurden.

Gemessene Bande	Position des Proteins in der Messung	Identifizierte Proteine	Accession Number	Molekulargewicht in kDa	Zahl zugewiesener Spektren	Signalpeptid (SignalP 4.0)	Cysteingehalt in %
<b>2</b> (Sarkosyl A)	3	MOMP-like family protein [ <i>Simkania negevensis</i> Z]	gi 338732404 ref YP_004670877.1	47	193	ja	0,48
<b>2</b> (Sarkosyl A)	4	MOMP-like family protein [ <i>Simkania negevensis</i> Z]	gi 338734237 ref YP_004672710.1	43	191	ja	0,53
<b>2</b> (Sarkosyl A)	10	MOMP-like family protein [ <i>Simkania negevensis</i> Z]	gi 338733016 ref YP_004671489.1	38	79	ja	0,61
<b>2</b> (Sarkosyl A)	11	MOMP-like family protein [ <i>Simkania negevensis</i> Z]	gi 338734236 ref YP_004672709.1	43	76	ja	0,52
<b>4</b> (Sarkosyl A)	1	MOMP-like family protein [ <i>Simkania negevensis</i> Z]	gi 338734236 ref YP_004672709.1	43	4918	ja	0,52
<b>4</b> (Sarkosyl A)	2	MOMP-like family protein [ <i>Simkania negevensis</i> Z]	gi 338734237 ref YP_004672710.1	43	2309	ja	0,53
<b>4</b> (Sarkosyl A)	3	MOMP-like family protein [ <i>Simkania negevensis</i> Z]	gi 338733966 ref YP_004672439.1	41	1015		0
<b>4</b> (Sarkosyl A)	4	MOMP-like family protein [ <i>Simkania negevensis</i> Z]	gi 338732404 ref YP_004670877.1	47	862	ja	0,48
<b>6</b> (Sarkosyl A)	9	MOMP-like family protein [ <i>Simkania negevensis</i> Z]	gi 338734237 ref YP_004672710.1	43	197	ja	0,53
<b>6</b> (Sarkosyl A)	12	hypothetical protein SNE_A20110 [ <i>Simkania negevensis</i> Z]	gi 338733906 ref YP_004672379.1	194	177	ja	0,17
<b>6</b> (Sarkosyl A)	18	MOMP-like family protein [ <i>Simkania negevensis</i> Z]	gi 338734236 ref YP_004672709.1	43	142	ja	0,52
<b>6</b> (Sarkosyl A)	22	MOMP-like family protein [ <i>Simkania negevensis</i> Z]	gi 338733966 ref YP_004672439.1	41	93		0

Betrachtet man in Tabelle 19 die Ergebnisse der Sarkosyl-Extraktion (Bahn 1) im 2. Lauf kann man unter den zehn Proteinen mit den meisten zugewiesenen Spektren sieben *S. negevensis*-Proteine vorfinden und drei Kontaminationen durch Keratinproteine (Daten nicht gezeigt). Unter den häufigsten zehn *S. negevensis*-Proteinen konnten davon acht als MOMP-ähnliche Proteine, ein Protein als putatives Außenmembranprotein OMP85 und ein hypothetisches Protein SNE\_A20110 identifiziert werden. SignalP 4 sagt für dieses hypothetische Protein ein Signalpeptid vorher, das ein entscheidendes Kennzeichen für Proteine der äußeren Membran darstellt. Auch die anderen angewendeten Programme wiesen darauf hin, dass es sich bei diesem hypothetischen Protein um ein Außenmembranprotein handelt (Tab. 21).

Von den mit n-octyl Polyoxyethylen extrahierten Proteinen (Bahn 2) konnten acht MOMP-ähnliche Proteine und das Außenmembranprotein Omp85 (Stephens und Lammel 2001) unter den zehn häufigsten *S. negevensis*-Proteinen identifiziert werden. Hier war aber auch unter den besten zehn *S. negevensis*-Proteinen eine putative Aconitat Hydratase. Das cytosolische Enzym Aconitase katalysiert die Isomerisation des Citrats zum Isocitrat im Citratzyklus und im Glyoxylatzyklus (Brito, Rezende *et al.* 2011).

Betrachtet man das Ergebnis der MS-Messung für die mit Triton X-114 extrahierten Proteine (Bahn 3), findet man unter den insgesamt zehn häufigsten Proteine in der Messung, keine *S. negevensis*-Proteine sondern nur Keratine und Amöbenproteine (Daten nicht gezeigt). Der Grad der Verunreinigung von *S. negevensis*-Proteinen, die nicht der Außenmembran zuzuordnen sind, ist ebenfalls hoch. Die ersten beiden identifizierten *S. negevensis*-Proteine in der MS-Messung - an den Positionen 11 und 14 - sind Untereinheiten der DNA gerichteten RNA-Polymerase. An Position 17 wurde der Elongationsfaktor Tu (EF-TU) gefunden, der bei der Translation wichtig ist und zudem membranassoziiert vorliegen kann (Nieves, Heang *et al.* 2010). Des Weiteren wurde eine Untereinheit einer DNA Gyrase an Position 25 identifiziert. Diese fungiert als Typ 2 Topoisomerase, die in der DNA negative "supercoils" einführt (Gore, Bryant *et al.* 2006). Erst an der 19. Position folgt ein der Außenmembran zugehöriges MOMP-ähnliches Protein. Man konnte hier insgesamt vier MOMP-ähnliche Proteine unter den häufigsten zehn *S. negevensis*-Proteinen und zwei hypothetische Proteine finden, von denen eines (SNE\_A201110) auch unter den häufigsten zehn *S. negevensis*-Proteine der mit Sarkosyl behandelten Probe war. Das andere hypothetische Protein (SNE\_A05500) wies, wie in Tabelle 21 angeführt, keine außenmembran-typischen Eigenschaften auf.

**Tab. 21: Vergleich zweier hypothetischer Proteine und eines MOMP-ähnlichen Protein aus Bahn 3 (Triton X) des 2. Laufs mittels der angewendeten bioinformatischen Software**

Protein	SignalP 3	SignalP 4	TMHMM ( $\alpha$ -helix)	BOMP ( $\beta$ -barrel)	PSORTdb
MOMP-like (Position 19)	ja	ja	nein	ja	Außenmembranprotein
SNE_A20110	ja	ja	nein	nein	Außenmembranprotein
SNE_A05500	nein	nein	nein	nein	unbekannt

Eine Protein-BLAST-Analyse (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) der hypothetischen Proteine aus Tabelle 21 zeigte bei SNE\_A05500 lediglich zu zwei hypothetischen Proteinen des *S. negevensis* Genoms 27% Identität und zu einem hypothetischen Protein von *Anopheles darlingi* (Stechmücke) 25% Identität. Die Protein-BLAST-Analyse von SNE\_A20110 wies auf ein Protein hin, das beim Typ-III-Sekretionssystem involviert sein könnte, da hier mehrere Ähnlichkeiten mit Typ-III-Sekretionsproteinen anderer Chlamydien auftraten und bekannt ist, dass diese innerhalb der *Chlamydiales* konserviert sind (Collingro, Tischler *et al.* 2011).

Die vier häufigsten - bzw. in den Banden 2 und 6 einzigen - *S. negevensis*-Proteine mit zwei oder mehr Peptiden des 1. Laufs (Sarkosyl A) sind in Tabelle 20 angeführt. Vorweg ist zu sagen, dass alle gefundenen *S. negevensis*-Proteine des 1. Laufs auch in der Bahn 1 (Sarkosyl B) des 2. Laufs gefunden wurden. Wie in Tabelle 17 bereits gezeigt, ist die Zahl der gefundenen Proteine des 1. Laufs wesentlich geringer, da hier nur drei Banden gemessen wurden. Die jeweils vier besten Hits für *S. negevensis*-Proteine sind - bis auf das bereits erwähnte hypothetische Protein SNE\_A20110 in der 6. Bande - MOMP-ähnliche Proteine. Interessant ist, dass in allen drei Banden idente MOMP-ähnliche Proteine gefunden wurden, die ein Molekulargewicht von ca. 40 kDa aufweisen, obwohl die Banden an unterschiedlichen Positionen im Gel ausgeschnitten wurden (Abb. 15).

Ein Vergleich mit den Genomvorhersagen und den MS-Ergebnissen zeigte, dass in den Bahnen 1 (Sarkosyl B) und 2 (POE) alle vorhergesagten MOMP (2 Kopien) und MOMP-ähnlichen Proteine massenspektrometrisch identifiziert wurden (Tab. 22). Diese Proteine waren häufig, wenn man sich auf die Anzahl der zugewiesenen Spektren bezieht (vgl. Tab. 19). Ebenso konnten die drei homologen Kopien des polymorphen Membranproteins PmpB von *Chlamydiaceae* und das Außenmembranprotein Omp85 in allen drei Bahnen

## Ergebnisse

des 2. Laufs gemessen werden. Das Peptidoglykan-assoziierte Lipoprotein PAL konnte jedoch in keiner der Bahnen bzw. Banden gefunden werden.

**Tab. 22:** Vergleich von *in silico*-vorhergesagten mit massenspektrometrisch-nachgewiesenen Außenmembranproteinen von *Simkania negevensis* des 1. und 2. Laufs. „×“ bedeutet „Protein(e) abwesend“.

<i>in silico</i> - vorhergesagte Proteine (Anzahl)	Gefundene Proteine durch MS (mit ≥ 2 Peptiden)					
	1. Lauf			2. Lauf		
	Sarkosyl A - 2	Sarkosyl A - 4	Sarkosyl A - 6	Sarkosyl B	POE	Triton X
<b>MOMP (2)</b>	×	×	×	2	2	1
<b>MOMP-ähnliche Proteine (35)</b>	4	26	3	35	35	29
<b>PAL (1)</b>	×	×	×	×	×	×
<b>yaeT,Omp85 (1)</b>	×	×	×	1	1	1
<b>PmpB (3)</b>	×	×	×	3	3	3
<b>Hypothetische Proteine (1470)</b>	×	3	1	88	185	130

Vergleicht man letztlich die drei unterschiedlichen Extraktionsmethoden anhand der gefundenen Außenmembranproteine, konnten viele der häufigsten *S. negevensis*-Proteine in jeder der drei Bahnen gefunden werden. Zusätzlich zeigte die MS ein replizierbares Resultat der mit Sarkosyl-extrahierten Außenmembranproteine.

Dieses replizierbare Ergebnis zeigt sich ebenfalls, wenn man die häufigsten cysteinreichsten Proteine betrachtet. Tabelle 23 zeigt drei cysteinreiche hypothetische Proteine, wobei SNE\_A09260 in Bahn 1 und 2 das cysteinreichste hypothetische Protein (4,2%) war und nur in Bahn 3 ein Protein mehr Cysteingehalt aufwies (4,8%). Dieses ist laut PSORTdb ein cytoplasmatisches Protein und weist bei einer Protein-BLAST-Analyse eine mögliche Rhodanase-ähnliche Domäne auf.

**Tab. 23:** Drei häufige cysteinreiche Proteine aus den mit Sarkosyl B (1), n-octyl POE (2) und Triton X (3) extrahierten Proteine des 2. Laufs, charakterisiert durch den Cysteingehalt, das Molekulargewicht (MG), das Vorhandensein eines Signalpeptids (S), einer  $\alpha$ -Helix ( $\alpha$ H), eines  $\beta$ -Barrels ( $\beta$ B) und der Lokalisation durch PSORTdb (P). „×“ steht für abwesend und „u“ steht für unbekannt. Die Position des Proteins bezieht sich auf die Position in der gesamten MS-Messung.

Hypothetisches Protein	MS-Position des Proteins aus			Cystein- gehalt in %	MG in kDA	S	$\alpha$ H	$\beta$ B	P
	1	2	3						
SNE_A09260	104	43	211	4,2	11	×	×	×	u
SNE_A09240	117	72	210	2,1	11	×	×	×	u
SNE_A09250	205	187	465	2,1	11	×	×	×	u



## Ergebnisse

Gemeinsam ist den hypothetischen Proteinen aus Tabelle 23, dass sie alle ein Molekulargewicht von 11 kDa, kein Signalpeptid, keine alpha-Helixe, keine beta-Barrels und laut PSORTdb eine unbekannte Lokalisation besitzen.

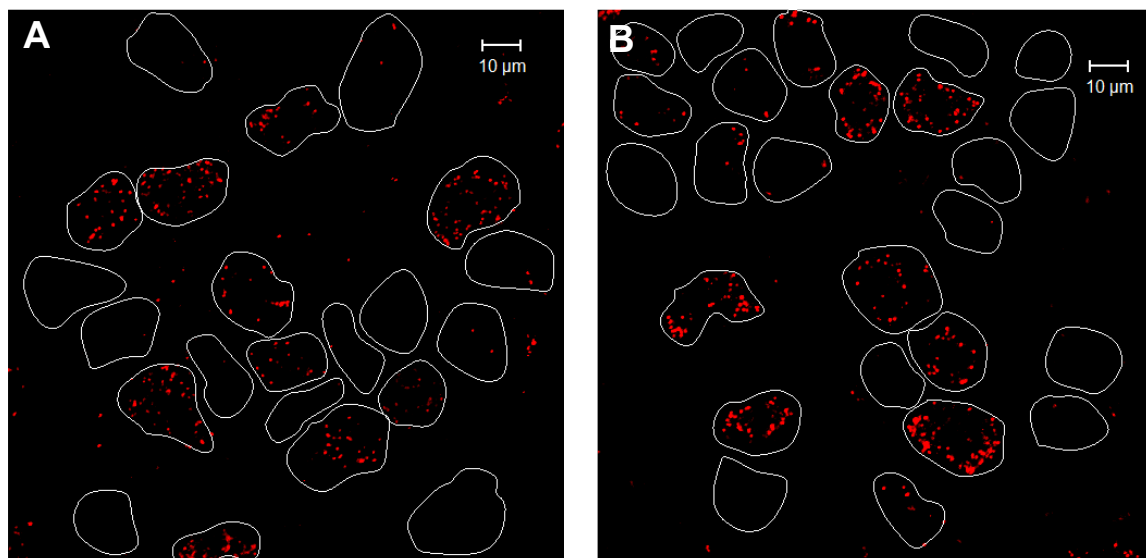
Analysiert man diese Proteine weiter mit Protein-BLAST, stellt man interessanterweise fest, dass diese Proteine untereinander Sequenzidentitäten von 72% aufweisen. Diese Proteine besitzen zudem eine putative konservierte NifH-Domäne, die in Proteinen von Cyanobakterien gefunden wurde, denen vermutlich eine Rolle bei der Stickstofffixierung zugesprochen wird. Ob diese aber eine Funktion in der Außenmembran haben bleibt fraglich, da man keine Anzeichen für außenmembran-typische Merkmale durch die *in silico*-Analysen zeigen konnte.

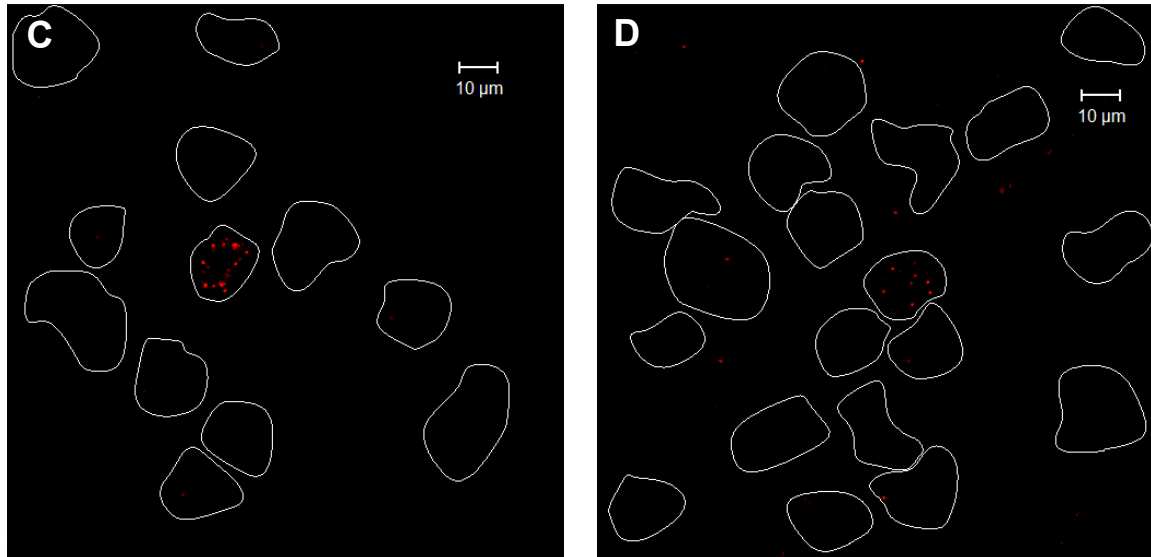
An dieser Stelle ist es nochmals wichtig zu betonen, dass keine cysteinreichen Proteine in der massenspektrometrischen Messung von *S. negevenis* identifiziert wurden, die man als Außenmembranproteine charakterisieren könnte.

### 3.4 Stabilitätsverhalten von *Simkania negevensis*

Mitglieder der *Chlamydiaceae* besitzen anstelle des Peptidoglykans die cysteinreichen Proteine OmcA und OmcB, die durch Disulfidbindungen einen Komplex in der äußeren Membran bilden, der für die Stabilität der EBs verantwortlich ist (Hatch 1996). Bei *Simkania negevensis* konnten im Genom weder Gene einer vollständigen Peptidoglykansynthese, noch Homologe für die Kodierung der cysteinreichen Proteine OmcA und OmcB gefunden werden (Collingro, Tischler *et al.* 2011). Die Ergebnisse der massenspektrometrischen Analyse (3.3) zeigten ebenfalls keine Homologe für OmcA oder OmcB und darüber hinaus keine cysteinreichen Proteine, die eine hohe Häufigkeit und bei *in silico*-Analysen Merkmale von Außenmembranproteinen aufwiesen (Tab. 19, 20 und 23).

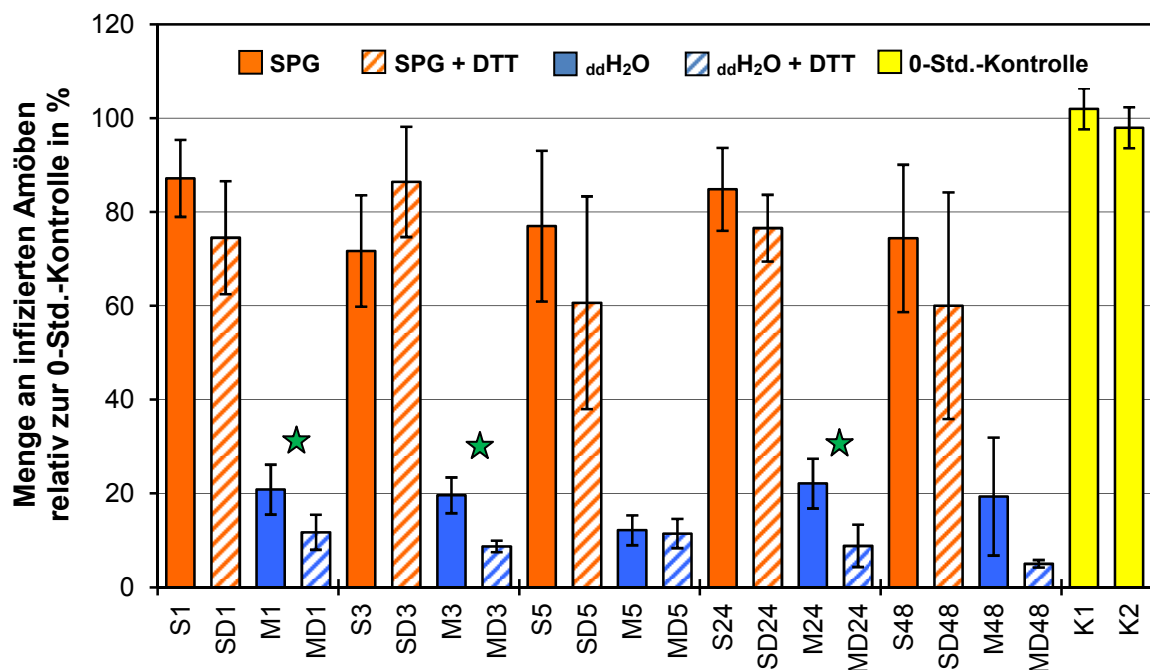
Um dies experimentell zu bestätigen wurde ein Stabilitätsexperiment wie in 2.17 beschrieben durchgeführt. Entscheidend war die Zugabe des reduzierenden Reagents Dithiothreitol (DTT), das Disulfidbindungen zwischen Proteinen reduziert (Cleland 1964; Rüegg, Rudinger *et al.* 1977) und dadurch die Stabilität von EBs beeinflussen würde. In vier Replikaten wurden die *S. negevensis*-Zellen in SPG, SPG mit 5mM DTT,  $\text{ddH}_2\text{O}$  und  $\text{ddH}_2\text{O}$  mit 5 mM DTT für jeweils 1, 3, 5, 24 und 48 Stunden inkubiert. Jede Amöbenzelle (weiße Kontur), die mit mehr als zehn *S. negevensis*-Zellen (rot) infiziert war, wurde als infiziert gewertet (Abb. 16). In den Bildern A (SPG) und B (SPG + 5mM DTT) kann man erkennen, dass viele Amöben infiziert sind, während in den Bildern C ( $\text{ddH}_2\text{O}$ ) und D ( $\text{ddH}_2\text{O}$  + 5mM DTT) nur jeweils eine Amöbenzelle infiziert ist (Abb. 16). Hier wird ein Unterschied in der Behandlung der Zellen in SPG und  $\text{ddH}_2\text{O}$  deutlich.





**Abb. 16: Immunfluoreszenzmikroskopieaufnahmen des Ein-Stunden-Zeitpunkts aus dem Stabilitäts-experiments mit *Simkania negevensis* EBs.** Für das repräsentative Bild der unterschiedlichen Inkubationen der EBs (A: SPG; B: SPG + 5mM DTT; C:  $ddH_2O$ ; D:  $ddH_2O$  + 5mM DTT) zum Ein-Stunden-Zeitpunkt wurde der anti-Sn-Antikörper in Cy3 (rot) verwendet. Zu sehen sind mehrere *Acanthamoeba* sp. UVC1-Zellen (Kontur in weiß), die mit unterschiedlich vielen *S. negevensis*-Zellen (in rot) infiziert sind. Maßstab: 10  $\mu m$ .

Das zusammengefasste Ergebnis ist dem Graphen aus Abbildung 17 zu entnehmen. Auf den ersten Blick kann man, unabhängig von DTT, deutliche Unterschiede zwischen der hohen Infektionsrate der in SPG inkubierten EBs (über 60%) und der niedrigen Infektionsrate der EBs in  $ddH_2O$  (unter 25%) erkennen.



**Abb. 17: Stabilitätsexperiment mit *Simkania negevensis*.** S: SPG; SD: SPG+5mM DTT; M:  $ddH_2O$ ; MD:  $ddH_2O$ +5mM DTT; Zeitpunkte: 1,3,5,24 und 48 Stunden; K1+2: Kontrolle. Mit grünem Stern markiert: Signifikanter Unterschied laut t-Test mit p-Wert < 0,05.

## Ergebnisse

Die Infektionsrate der mit SPG inkubierten EBs bleibt für alle fünf Zeitpunkte (S1, S3, S5, S24 und S48) zwischen ca. 70 und 90% mit einer niedrigen Standardabweichung der jeweils vier Replikate äußerst konstant. Auch bei den mit  $\text{ddH}_2\text{O}$  mit und ohne 5 mM DTT behandelten EBs ist die Anzahl der infizierten Amöben der unterschiedlichen Zeitpunkte ähnlich. Eine verhältnismäßig hohe Standardabweichung und eine niedrigere Infektionsrate, verglichen mit den anderen Zeitpunkten, sind bei SD5 und SD48 zu sehen. Vergleicht man die Infektionsraten der einzelnen Zeitpunkte von SPG mit und ohne DTT kann man keine deutlichen Unterschiede erkennen. Die Infektionsrate und somit die Stabilität der EBs in SPG wurde folglich nicht durch Dithiothreitol beeinflusst. Bei den in  $\text{ddH}_2\text{O}$  mit und ohne DTT inkubierten EBs konnte man hingegen nur bei dem 5- und 48-Stunden-Zeitpunkt keinen Unterschied erkennen (laut t-Test), wobei für den letzteren Zeitpunkt eine deutliche Standardabweichung bei M48 zu erkennen ist. Hier könnte DTT einen Einfluss auf die Stabilität der Außenmembran haben, wobei die Zellen durch die Inkubation mit  $\text{ddH}_2\text{O}$  bereits erheblich destabilisiert wurden und DTT zusätzlich toxisch wirken kann (<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/d0632?lang=de&region=AT>).

Die Ergebnisse verdeutlichten, dass der Mechanismus der Stabilisierung und somit die Zusammensetzung der äußeren Membran von *Simkania negevensis* und von *Clamydiaceae* unterschiedlich sind, da die Infektionsrate bzw. die Stabilität von *S. negevensis* EBs in SPG durch Dithiothreitol nicht beeinflusst wurde.

## 4 Diskussion

### 4.1 Die Außenmembran von *Chlamydiales* EBs

Die Außenmembran der EBs der *Chlamydiales* dient für die Stabilität, die Anheftung an Wirtszellen, den Stoffaustausch und die Differenzierung von EBs zu RBs. Das Hauptziel dieser Arbeit war, die Zusammensetzung der äußeren Membran von EBs zu charakterisieren. Bislang gibt es nur mehrere Studien über die Außenmembran von *Chlamydiaceae* (Birkelund, Morgan-Fisher *et al.* 2009; Everett und Hatch 1995; Hatch 1996; Liu, Afrane *et al.* 2010; Moelleken und Hegemann 2008) und die Außenmembran anderer Familien der Ordnung *Chlamydiales* ist wenig untersucht. Um einen besseren Einblick in die Verschiedenartigkeit dieser Familien zu bekommen wurden kürzlich von Heinz *et al.* erste proteomische Untersuchungen zu Außenmembranproteinen von *Protochlamydia amoebophila* unternommen (Heinz, Pichler *et al.* 2010) und in dieser Studie für drei weitere Spezies der Umweltchlamydien, wobei im Vordergrund *Simkania negevensis* stand.

#### 4.1.1 Vom Genom zum Proteom

*In silico*-Vorhersagen der Außenmembranproteine zeigten (Collingro, Tischler *et al.* 2011; Heinz, Myers *et al.* 2008; Heinz, Tischler *et al.* 2009) erhebliche Unterschiede bezüglich der anhand der Genomanalyse vorhergesagten Zusammensetzung der Außenmembran zwischen *Chlamydiaceae*, *Waddliaceae*, *Parachlamydiaceae* und *Simkaniaceae*.

Um die Genomanalysen hinsichtlich der Außenmembran von *S. negevensis*, *W. chondrophila* und *P. acanthamoebae* zu bestätigen, sollten die Außenmembran-Proteome aus hochaufgereinigten EBs analysiert werden. Für die Extraktion der Proteine wurden drei verschiedene Detergentien angewendet, die in der Aufbereitung von Außenmembranproteinen von Chlamydien verbreitet sind (Arnold und Linke 2008; Caldwell, Kromhout *et al.* 1981; Everett, Desiderio *et al.* 1994).

Eine SDS-PAGE der extrahierten Außenmembranproteine zeigte erhebliche Unterschiede im Bandenmuster von den *S. negevensis*-Proteinen zu den anderen beiden Umweltchlamydien. Hier erschienen nur drei starke Banden und das gleiche Bandenmuster war für alle gewählten Detergentien zu beobachten.

Dies ist in Übereinstimmung mit früheren Untersuchungen (Friedman, Dvoskin *et al.* 2003) und unterscheidet sich auch von einer SDS-PAGE mit Außenmembranproteinfraktionen der pathogenen Chlamydien (Caldwell, Kromhout *et al.* 1981; Everett und Hatch 1995; Liu, Afrane *et al.* 2010).

In den Ergebnissen des 1. Laufs der MS-Messung hätte man vermutet, dass die 40 kDa großen MOMP-ähnlichen Proteine nur in der Bande, die man bei ca. 40 kDa (laut Marker) aus dem SDS-Polyacrylamidgel (Abb. 15) ausgeschnitten hatte, enthalten sind. Hier konnte man aber auch MOMP-ähnliche Proteine in der oberen (bei 70 kDa) und unteren Bande (bei 20 kDa) finden. Eine Ursache hierfür liegt in der Bildung von Komplexen, die durch SDS-PAGE nicht vollständig denaturiert wurden und somit wegen der Protein-Protein-Bindungen ein größeres Molekulargewicht aufwiesen (Heinz, Pichler *et al.* 2010). Auf der anderen Seite wurde ein 194 kDa großes Protein in der Bande bei 70 kDa gefunden. Dies könnte an einem "proteolytischen Turnover" liegen (Heinz, Pichler *et al.* 2010), da ein Abbau während der Hochaufreinigung und der Extraktion der Proteine eher unwahrscheinlich ist, da in Anwesenheit von Protease-Inhibitoren gearbeitet wurde.

Die massenspektrometrischen Analysen des 1. und 2. Laufs von *S. negevensis*-Proteinen führten zu replizierbaren Ergebnissen. Sowohl bei den Sarkosyl-extrahierten Außenmembranproteinen aus zwei unabhängigen Läufen, als auch bei zwei unterschiedlichen Extraktionsmethoden eines Laufs wurden idente häufige Proteine gefunden, wobei in den Banden des 1. Laufs nur sehr wenige Proteine identifiziert werden konnten, da hier nur Proteine aus drei Banden gemessen wurden. Dies war vergleichbar mit der Analyse der Außenmembranproteine von *P. amoebophila*, bei der wenige Proteine in einzelnen Banden (1 - 4) und viele Proteine in einer ganzen Bahn (282) eines Gels gefunden wurden (Heinz, Pichler *et al.* 2010).

Von den MOMP-ähnlichen Proteinen, von denen laut Genomvorhersage 35 identifiziert wurden (Collingro, Tischler *et al.* 2011), konnten in den mit Sarkosyl- und n-octyl POE-extrahierten Proteinfraktionen auch alle in der MS-Messung gefunden werden. Ebenso konnten im 2. Lauf die zwei Kopien von MOMP (in der mit Triton-X-extrahierten Proteinfraktion nur eine Kopie), die drei Kopien von PmpB und Omp85 in allen drei Bahnen identifiziert werden. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde ein Modell der Außenmembran (Abb. 18), in Anlehnung an das Modell der Zellwand von *Chlamydiaceae* (Abb. 6) erstellt.

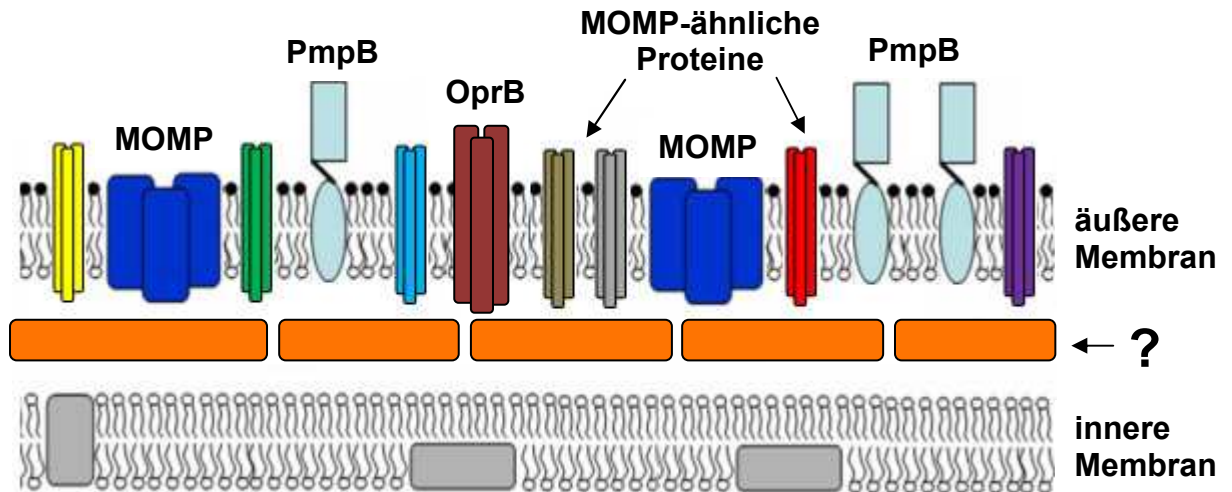


Abb. 18: Modell der inneren und äußeren Membran von *Simkania negevensis*.

Das Modell beinhaltet die am häufigsten auftretenden MOMP-ähnlichen Proteine, die als Porine durch die äußere Membran gehen und in allen Proben als häufigste Proteine durch MS identifiziert wurden. Neben diesen MOMP-ähnlichen Proteinen sind die drei Kopien von PmpB und OprB, die in den Proben ebenfalls häufig waren. Überraschend war die eher geringe Häufigkeit der beiden Kopien von MOMP, denen nur wenige Spektren zugewiesen werden konnten. Im Gegensatz dazu wurden bei *P. amoebophila* zwar keine Homologe für MOMP gefunden, aber zwei dominante Proteine entdeckt, welche die Funktion von MOMP übernehmen könnten (Heinz, Pichler *et al.* 2010).

Das größte Fragezeichen steht jedoch für die Art und Weise der Aufrechterhaltung der Struktur, da bei *S. negevensis* weder in den *in silico*-Vorhersagen (Collingro, Tischler *et al.* 2011) noch in der MS-Messung dieser Studie die cysteinreichen Proteine OmcA und OmcB gefunden wurden. Diese cysteinreichen Proteine bilden durch Disulfidbrückenbindungen den COMC von *Chlamydiaceae* und sorgen so für die Stabilität der Zellwand der EBs (Hatch 1996). Bei den anderen beiden Umweltchlamydien wurde zumindest das cysteinreiche Protein OmcB vorhergesagt (Collingro, Tischler *et al.* 2011) und bei *P. amoebophila* konnten beide cysteinreichen Proteine mittels MS-Messung gefunden werden (Heinz, Pichler *et al.* 2010). Welcher Mechanismus der Stabilisierung bei *S. negevensis* ist, bleibt weiter unklar. Eine Möglichkeit ist, dass die MOMP-ähnlichen Proteine strukturgebend sind, oder diese Funktion von einer der unzähligen hypothetischen Proteine übernommen wird, die teilweise häufig waren. Oder ist doch Peptidoglykan für die Stabilität der EBs verantwortlich? Gegen Peptidoglykan sprechen die *in silico*-Vorhersagen von Heinz *et*

*al.*, die nur Teile des Peptidoglykan-Synthesewegs im Genom von *S. negevensis* finden konnte (Heinz, Myers *et al.* 2008). Dieser ist vergleichbar mit dem verkürzten Syntheseweg des Peptidoglykans von *Chlamydiaceae* (McCoy und Maurelli 2006). Für die pathogenen Chlamydien konnte gezeigt werden, dass Gene für die Synthese des Peptidoglykans von *C. trachomatis* in *E. coli* heterolog exprimiert werden konnten und zu funktionellen Proteinen führten (McCoy und Maurelli 2005; McCoy, Sandlin *et al.* 2003; Patin, Bostock *et al.* 2012). Auffallend in der massenspektrometrischen Messung der *S. negevensis*-Proteine war jedoch die Abwesenheit des *in silico*-vorhergesagten Peptidoglykan verbundenen Lipoproteins (Pal), was wiederum gegen eine Theorie des Peptidoglykans in der Zellwand von *S. negevensis* sprechen würde. Im Vergleich wurde Pal in der MS-Messung bei *P. amoebophila* (Heinz, Pichler *et al.* 2010) und bei *C. trachomatis* (Liu, Afrane *et al.* 2010) gefunden. Bei *P. amoebophila* wiederum konnte der nahezu komplette Syntheseweg des Peptidoglykans gefunden werden (Horn, Collingro *et al.* 2004). Hier wäre es also durchaus interessant weitere experimentelle Analysen hinsichtlich des Vorhandenseins von Peptidoglykan in der Zellwand von Umweltchlamydien insbesondere von *S. negevensis* zu unternehmen, wie es bereits bei pathogenen Chlamydien (Fox, Rogers *et al.* 1990; Su, Zhang *et al.* 1985) gemacht wurde.

### **4.1.2 Probleme in der Analyse von Außenmembranproteinen der Chlamydien EBs**

#### **4.1.2.1 Die Hochaufreinigung der EBs von *S. negevensis*, *W. chondrophila* und *P. acanthamoebae***

Bei der proteomischen Analyse der EBs ist ihre Hochaufreinigung von entscheidender Bedeutung, da Bestandteile der Wirtszelle und Retikularkörperchen weitestgehend entfernt werden sollten, um nur Proteine der EBs massenspektrometrisch zu erfassen. Die Wahl des Gradienten entscheidet über Reinheit, aber auch Ausbeute der Hochaufreinigung. Je stringenter der Gradient, desto geringer - aber dafür reiner - ist die Ausbeute der hochaufgereinigten EBs. Bei den Hochaufreinigungen der EBs in dieser Arbeit wurde mit einem Protokoll für die Hochaufreinigung von *P. amoebophila* EBs gearbeitet (Sixt, Heinz *et al.* 2011). Hierfür wurden die Wirtszellen aufgebrochen und die EBs durch verschiedene Gastrografingradienten ultrazentrifugiert. Eine Hauptveränderung bestand lediglich in der höher konzentrierten Zusammensetzung der



Gastrografingradienten, die durch Tests mit *S. negevensis* EBs ermittelt wurden, um eine möglichst reine EB-Fraktion zu erhalten.

Die endgültigen Hochaufreinigungen wurden mittels Transmissionselektronenmikroskopie überprüft (Abb. 8). Diese stellt trotz des zeitaufwändigen und teuren Verfahrens die bis dato beste Methode dar, um zwischen EBs und RBs zu unterscheiden (Rake 1957). EBs werden meist als dichtgepackte, runde Zellen beschrieben, die kleiner sind als RBs (Miyashita, Kanamoto *et al.* 1993; Wolf, Fischer *et al.* 2000). Wie bei Kahane *et al.* beschrieben, waren auch in dieser Studie in den 0,2-0,3 µm großen EBs elektronendurchsichtige und elektronendichte Teile - die die kondensierte DNS widerspiegeln - in den runden Zellen zu sehen (Kahane, Kimmel *et al.* 2002). Auch von der Größe her sind die meisten Zellen EBs, da RBs 0,3-0,7 µm groß sind (Kahane, Kimmel *et al.* 2002). Die *Waddlia* EBs werden ebenso als dichtgepackte Kugeln von 0,2-0,5 µm Größe beschrieben (Rurangirwa, Dilbeck *et al.* 1999), die mit den hochaufgereinigten *W. chondrophila* EBs in dieser Studie übereinstimmen. Von einem zusätzlichen Entwicklungsstadium, dem sogenannten "Crescent body" (Halbmondkörperchen), berichtet eine Gruppe bei *P. acanthamoeba* (Greub und Raoult 2002). Diese Form konnte auch in den hochaufgereinigten *P. acanthamoebae* EBs dieser Studie gefunden werden. Es sei dahingestellt, ob es sich hier um eine Veränderung der Form aufgrund der Fixierung oder tatsächlich um "Crescent bodies" handelt (Hurbain und Sachse 2011). Eine andere Variante, die cryo-Elektronenmikroskopie, könnte hier aufschlussreicher sein, da die Zellen bei dieser Methode weder geschnitten, noch umständlich fixiert werden müssen (Pilhofer, Ladinsky *et al.*). Die TEM-Bilder dieser Studie wiesen darauf hin, dass der Grad der Verunreinigung mit Wirtszellbestandteilen und RBs in den EB-Suspensionen - vergleichbar mit anderen Studien (Heinz, Pichler *et al.* 2010; Liu, Afrane *et al.* 2010; Sixt, Heinz *et al.* 2011) - gering war.

Ein vollständiges Entfernen von Amöbenzellbestandteilen konnte man letztlich nicht erreichen, da in den MS-Messungen neben den Chlamydienproteinen ebenso Amöbenproteine detektiert wurden. Bei den mit Sarkosyl-extrahierten *S. negevensis*-Proteinfraktionen des 2. Laufs beispielsweise konnten 21% Amöbenproteine identifiziert werden, von denen jedoch keine unter den ersten 30 häufigsten Proteinen in der gesamten Messung waren. Im Vergleich dazu war der Anteil an Amöbenproteinen nur 5% in der MS-Messung bei *P. amoebophila* (Heinz, Pichler *et al.* 2010), wobei hier weniger Proteine insgesamt (297 zu 420 bei *S. negevensis*) gefunden wurden, da mit einem weniger sensitiven Massenspektrometer gemessen wurde.

#### 4.1.2.2 Extraktion von Außenmembranproteinen

Da in dieser Studie keine Analyse des gesamten Proteoms der EBs vorgenommen wurde, sondern eine Identifizierung der Proteine in der äußeren Membran von EBs, war es entscheidend geeignete Extraktionsmethoden zu wählen, um die Außenmembranproteine von den cytoplasmatischen Proteinen und inneren Membranproteinen der EBs zu trennen. Hierfür wurden drei verschiedene Detergentien gewählt, welche bei der Extraktion von Außenmembranproteinen häufig verwendet werden (Arnold und Linke 2008). Ein Problem dieser Extraktionsmethoden ist, dass nicht alle cytoplasmatischen Proteine entfernt werden können, da diese auch membranassoziiert vorliegen können und außerdem viel häufiger als Außenmembranproteine sind. So konnte man in dieser Studie in allen untersuchten Proben den Elongationsfaktor TU (EF-TU) mit einer hohen Häufigkeit in der MS-Messung finden. EF-TU war ebenso bei proteomischen Analysen von *C. trachomatis* (Birkelund, Morgan-Fisher *et al.* 2009; Liu, Afrane *et al.* 2010) und *P. amoebophila* (Heinz, Pichler *et al.* 2010) häufig. In der Studie von Liu *et al.* wurden unter 3% cytoplasmatische Proteine in den mit Sarkosyl extrahierten COMC-Fractionen gefunden, wobei aber insgesamt nur durchschnittlich 25 Chlamydienproteine pro Messung identifiziert wurden. Hier wurden die mit Sarkosyl extrahierten Proteine jedoch nicht mittels SDS-Page getrennt und im Gel verdaut, sondern in Lösung verdaut (Liu, Afrane *et al.* 2010). Betrachtet man nur die 25 besten *Simkania negevensis*-Proteine in dieser Studie, war die cytoplasmatische Verunreinigung mit 4% vergleichbar gering.

In den gesamten Ergebnissen der mit Sarkosyl extrahierten Proteine der 2. Messung, wurden laut PSORTdb 64% cytoplasmatische Proteine gefunden, dafür aber insgesamt 319 Chlamydienproteine. Von diesen 319 Proteinen konnten durch PSORTdb 19 Außenmembranproteine identifiziert werden, was 70% der durch PSORTdb im gesamten Genom vorhergesagten Außenmembranproteine ausmacht. Im Vergleich dazu wurden bei *C. trachomatis* 60% (Liu, Afrane *et al.* 2010) der durch PSORTdb vorhergesagten Außenmembranproteine gefunden. Der Unterschied in der Proteinausbeute liegt vor allem darin, dass bei Liu *et al.* mit einer LTQ-FT Ultra gemessen wurde, während in dieser Studie ein LTQ Orbitrap Velos verwendet wurde, das um einiges sensitiver ist als andere Massenspektrometer, wodurch viel mehr auch nicht häufige Proteine identifiziert werden können (Olsen, Schwartz *et al.* 2009).

### 4.1.2.3 *In silico*-Vorhersagen

In den sequenzierten Genomen der *Chlamydiaceae* sind bis dato nur wenige Außenmembranproteine im Vergleich zu anderen intrazellulären Bakterien annotiert worden (Heinz, Pichler *et al.* 2008). Entscheidend bei den einzelnen Vorhersageprogrammen ist das Festlegen der “Thresholds“ (Schwellenwerte). Setzt man die Thresholds hoch bzw. konservativ, geht zwar viel Information verloren, aber das entsprechende Ergebnis ist dafür aussagekräftiger. Ein Hauptproblem der Vorhersageprogramme ist jedoch, dass diese für *Proteobacteria* optimiert wurden, da hier am meisten Sequenzen und experimentelle Daten vorhanden sind (Heinz, Pichler *et al.* 2008). Für die Vorhersage von Außenmembranproteinen von *S. negevensis* wurde mit den Standardeinstellungen der jeweiligen Programme gearbeitet. Diese Programme unterscheiden sich jedoch in den älteren und neueren Versionen, wie beispielsweise bei den Programmen SignalP 3.0 und SignalP 4.0 gezeigt wurde. SignalP 3.0 hat Probleme alpha-Helixe am Beginn der Proteine von Signalpeptiden zu unterscheiden und hat deshalb mehr Proteine mit Signalpeptiden gefunden (Petersen, Brunak *et al.* 2011), die dadurch als Außenmembranprotein in Frage kommen würden (Emanuelsson, Brunak *et al.* 2007). Dies erschwert Vergleiche mit älteren Studien, da die neueren Programme in den Vorhersagen zuverlässiger werden. Bessere Vorhersagen von Außenmembranproteinen wurden getroffen, indem mehrere Programme kombiniert wurden. Hier zeigte sich jedoch, dass manche der annotierten Außenmembranproteine durch keines der angewandten bioinformatischen Programme als mögliche Außenmembranproteine vorhergesagt wurden. Dies betraf beispielsweise eine Kopie des MOMP und ein MOMP-ähnliches Protein. Von den anderen 34 MOMP-ähnlichen Proteinen konnten durch PSORTdb nur sechs als Außenmembranproteine identifiziert werden, wobei 30 von 35 laut Vorhersage mit BOMP ein beta-Barrel aufwiesen, das für Porine kennzeichnend ist (Nikaido 2003).

### 4.1.3 Antikörper gegen Umweltchlamydien EBs

Die Produktion von Antikörpern gegen *S. negevensis* und *P. acanthamoebae* EBs war erfolgreich. Bei *W. chondrophila* führte die Herstellung unerwartet zu Antikörpern gegen *Acanthamoeba* sp. UWC1. Eine Ursache kann hier wohl nur an einer erhöhten Verunreinigung durch Amöbenzellbestandteile in den hochaufgereinigten EB-

Suspensionen liegen. Bei der Herstellung der Antikörper wurde die gleiche hochaufgereinigte EB-Charge verwendet, die auch für die Aufnahme der TEM-Bilder und für die Extraktion der Außenmembranproteine mit Sarkosyl verwendet wurde. Die TEM-Bilder zeigten - im Vergleich mit den anderen beiden Umweltchlamydien dieser Studie - eine minimal höhere Verunreinigung durch lysierte Amöbenzellen. Die massenspektrometrischen Messungen könnten hier aufschlussreich sein, wenn sehr viel mehr Amöbenproteine in den *W. chondrophila*-Proteinfraktionen im Vergleich zu den MS-Messungen der anderen beiden Umweltchlamydien gefunden werden.

Obwohl die Tests der Präimmunseren gegen Amöben negativ ausfielen, kann eine spätere Immunisierung der Tiere mit Amöben nicht ausgeschlossen werden, da Amöben weit verbreitet sind und sogar aus der Luft isoliert werden konnten (Rodriguez-Zaragoza 1994).

### 4.1.4 Die Stabilität der EBs von *S. negevensis*

Die Stabilität der Zellwand von *Chlamydiaceae* ist stark von den cysteinreichen Proteinen OmcA und OmcB, die über Disulfidbrücken Komplexe bilden, abhängig (Everett und Hatch 1995; Hatch 1996). Versuche zeigten, dass EBs, die mit dem anionischen Detergens Sarkosyl behandelt wurden, eine intakte Zellhülle aufwiesen, während mit Sarkosyl und einem reduzierendem Reagenz behandelte EBs keine intakte Außenwand aufwiesen, da hier die Proteine in Lösung gingen (Bavoil, Ohlin *et al.* 1984; Caldwell, Kromhout *et al.* 1981; Newhall, Wilbert *et al.* 1983). Hackstadt *et al.* zeigte in einem Versuch, dass aufgereinigte *C. trachomatis* EBs bei einer Behandlung mit dem reduzierendem Reagenz Dithiothreitol (DTT), das Disulfidbindungen von Proteinen reduziert (Cleland 1964; Rüegg, Rudinger *et al.* 1977), eine verminderte Infektionsrate gegenüber EBs besaßen, die nicht mit DTT inkubiert wurden (Hackstadt, Todd *et al.* 1985). Hier vermuteten die Autoren, dass es zu einer Reduktion der Disulfidbrückenbindungen der cysteinreichen Proteine kam und somit keine stabilisierenden Netzwerke der cysteinreichen Proteine gebildet wurden, was einen Einfluss auf die Infektionsrate der EBs hatte (Hackstadt, Todd *et al.* 1985).

Ein ähnliches Stabilitätsexperiment wurde für *S. negevensis* durchgeführt, um zu beweisen, dass die Stabilität von *S. negevensis* durch eine Behandlung mit DTT nicht beeinflusst wird, da *Simkania negevensis* keine Homologe für die cysteinreichen Proteine OmcA und OmcB der *Chlamydiaceae* besitzt (Collingro, Tischler *et al.* 2011). Darüber

hinaus ist der prozentuale Anteil von cysteinreichen Proteinen im Genom wesentlich geringer als bei anderen *Chlamydiales* (Abb. 19). In dieser Studie konnte man zudem zeigen, dass durch die massenspektrometrischen Messungen keine häufigen cysteinreichen Proteine gefunden wurden.

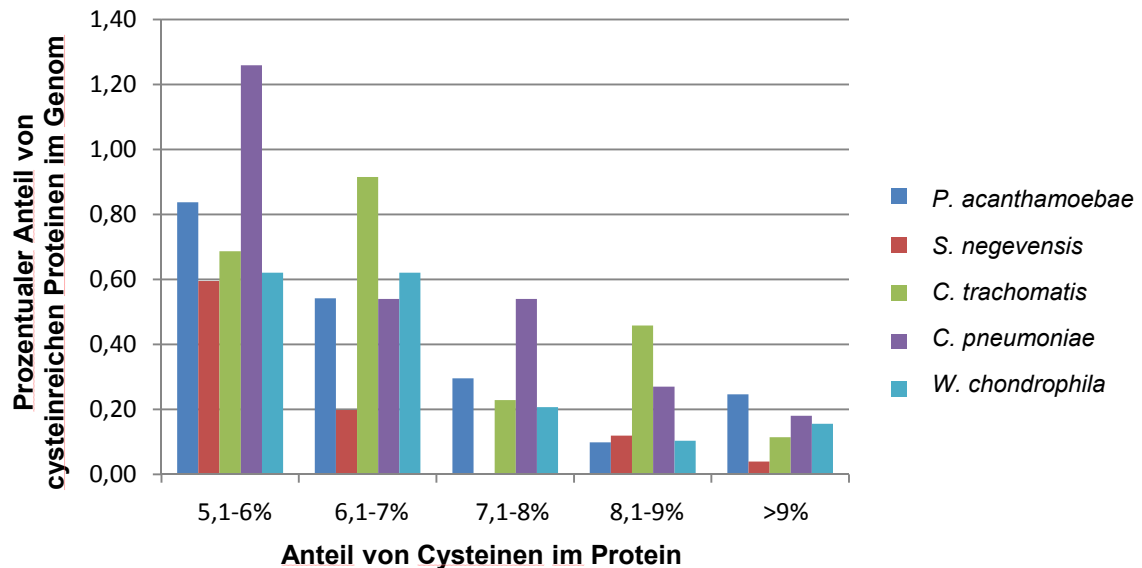


Abb. 19: Vergleich von *Chlamydiales* hinsichtlich cysteinreicher Proteine und Cysteinanteilen im Protein. Datenanalyse von Karin Aistleitner.

Schließlich zeigten die Ergebnisse des Stabilitätsexperiments, dass sich die Infektionsrate von in SPG mit und ohne DTT inkubierten EBs zu keinem der fünf Zeitpunkte unterschied. Im Vergleich dazu hatte DTT sehr wohl einen Einfluss auf die Infektionsrate und somit auf die Stabilität der *C. trachomatis* EBs (Hackstadt, Todd *et al.* 1985). Das Stabilitätsexperiment von *C. trachomatis* ist jedoch schlecht vergleichbar, da die Bedingungen während des Experiments (verschiedene Wirtszellen und Medien, Inkubationslänge, MOI, Temperatur bei der Inkubation, DTT-Konzentration) unterschiedlich waren. Aufschlussreicher sollten die Vergleichsexperimente mit *P. acanthamoebae* UV7 und/oder *Waddlia chondrophila* werden, die gleichen Bedingungen unterliegen. Ob es zu einem ähnlichen Effekt wie bei *C. trachomatis* kommen wird, sei dahingestellt, da man zwar das cysteinreiche Protein OmcB im Genom vorhergesagt hat, OmcA jedoch fehlt, das für den Außenmembrankomplex von *C. trachomatis* ebenso essentiell ist (Hatch 1996). Es bleibt auch abzuwarten, wie die Ergebnisse der Proteomanalyse von *P. acanthamoebae* und *W. chondrophila* ausfallen, die bis dato noch nicht vorliegen.

Ein weiterer Aspekt des Stabilitätsexperiments war die Inkubation der EBs in  $\text{ddH}_2\text{O}$  mit und ohne DTT. Wie bereits Kahane *et al.* zeigen konnte, war *S. negevensis* in destilliertem Wasser stabil und wies eine geringe Infektionsrate selbst nach sieben Tagen auf (Kahane, Platzner *et al.* 2004). Auch in dieser Studie konnte noch nach zweitägiger Inkubation der *S. negevensis*-Zellen in destilliertem Wasser eine Stabilität der Zellen - in Form von einer nachweislichen Infektionsrate - beobachtet werden. Kahane zeigte hingegen bei *C. trachomatis*, dass die Stabilität der Zellen bereits nach kurzer Inkubationszeit in  $\text{ddH}_2\text{O}$  stark eingeschränkt war und nach fünf Stunden keine intakten Zellen mehr vorhanden waren (Kahane, Platzner *et al.* 2004). Wie jedoch *S. negevensis* diese Stabilität in destilliertem Wasser aufrechterhalten kann, bleibt zu klären.

### 4.1.5 Ausblick

Die unterschiedliche Zusammensetzung der Außenmembran innerhalb der *Chlamydiales* spiegelt sich unter anderem in den verschiedenen Wirtsspektren der einzelnen Chlamydien wieder. Ein noch besseres Verständnis über den Aufbau und die Funktion der Proteine der Außenmembran von *Chlamydiales* könnte einen großen Erfolg in der Bekämpfung dieser teilweise pathogenen Bakterien darstellen. Da Chlamydien bislang nicht genetisch modifiziert werden konnten, erwies sich eine genomische und proteomische Analyse als eine sehr gute Methode für die Erforschung dieser obligat intrazellulären Bakterien. Kürzlich gelang es jedoch Wang und Kahane *et al.* ein Transformationssystem für *C. trachomatis* zu etablieren (Wang, Kahane *et al.* 2011). Diese neueste Errungenschaft könnte auch in der Erforschung der Außenmembran von Chlamydien eine wichtige Rolle spielen. Gene, die für Proteine in der Außenmembran codieren, könnten ausgeschaltet werden, um deren Funktion beispielsweise bei Infektionen zu klären.

In dieser Diplomarbeit konnten letztlich erste grundlegende Ergebnisse einer massenspektrometrischen Analyse der Außenmembran von *Simkania negevensis* präsentiert werden. Nun gilt es einzelne Proteine, die in den Messungen eine hohe Häufigkeit zeigten, zu charakterisieren, um wichtige Erkenntnisse in der Funktion dieser Proteine zu erhalten.

## 5 Zusammenfassung

Außenmembranproteine der obligat intrazellulären Chlamydien spielen, neben der Stabilisierung und der Differenzierung der Zelle im zweiphasigen Entwicklungszyklus, auch bei der Anheftung an die Wirtszellen, der Aufnahme von Nährstoffen und der Abgabe von Stoffwechselendprodukten eine wichtige Rolle. Erste Genomanalysen zeigten wesentliche Unterschiede bezüglich codierter Außenmembranproteine, die auf eine unterschiedliche Zusammensetzung der äußeren Membran der *Chlamydiaceae* und der Umweltchlamydien *Simkania negevensis*, *Waddlia chondrophila* und *Parachlamydia acanthamoebae* hinweisen (Collingro, Tischler *et al.* 2011). Hauptbestandteile der Außenmembran der *Chlamydiaceae*, wie das Porin “Major outer membrane protein“ (MOMP), die polymorphen Membranproteine (Pmps) und die cysteinreichen Proteine OmcA und OmcB, konnten nur teilweise in den Genomen dieser Umweltchlamydien identifiziert werden.

Daher war das Hauptziel dieser Arbeit, die Genomvorhersagen durch eine proteomische Analyse der Außenmembranproteine dieser drei Umweltchlamydien zu bestätigen und darüber hinaus zu ergänzen. Hierfür wurden die Elementarkörperchen (EBs) mittels Ultrazentrifugation über einen Dichtegradienten aufgereinigt, die Außenmembranproteine mit drei verschiedenen Methoden aus den EBs extrahiert und die im Gel verdauten Proteine massenspektrometrisch analysiert. Für *S. negevensis* konnten - in Übereinstimmung mit *in silico*-Vorhersagen - in den massenspektrometrischen Messungen der Außenmembranproteinfraktionen weder OmcA noch OmcB identifiziert werden. Als Hauptbestandteil der Außenmembran von *S. negevensis* wurden hingegen 35 MOMP-ähnliche Proteine identifiziert. Weiters wurden mehrere Kopien des Autotransporters PmpD, sowie zahlreiche uncharakterisierte Proteine in der Außenmembranfraktion gefunden, die es gilt weiter zu analysieren, um ihre Funktion beispielsweise bei Infektionen oder im Entwicklungszyklus zu klären. Der geringe Cysteingehalt der MOMP-ähnlichen Proteine und der insgesamt gefundenen Proteine weist darauf hin, dass der Mechanismus zur Stabilisierung der Außenmembran bei *S. negevensis* grundlegend anders sein muss. Diese Ergebnisse konnten durch ein Stabilitätsexperiment verdeutlicht werden, in dem die Stabilität von *S. negevensis* im Gegensatz zu *Chlamydiaceae* (Hackstadt, Todd *et al.* 1985) durch die Behandlung mit Dithiothreitol (DTT), das Disulfidbrücken reduziert, nicht beeinträchtigt wurde. Zusätzlich zur Charakterisierung der Außenmembran wurden auch spezifische Antikörper gegen aufgereinigte *S.*

## Zusammenfassung

*negevensis* und *P. acanthamoebae* EBs hergestellt. Diese Antikörper können für weitergehende Untersuchungen herangezogen werden, um immunodominante Außenmembranproteine zu identifizieren.

Letztlich konnte durch diese Arbeit erstmals ein Einblick in die Zusammensetzung der Proteine in der Außenmembran von *S. negevensis* EBs gemacht werden, die als Grundlage für die weitere Charakterisierung von Struktur und Funktion dieser Proteine herangezogen werden kann.



## 6 Summary

Outer membrane proteins of the obligate intracellular chlamydiae play a key role for cell integrity and differentiation during the biphasic developmental cycle, and furthermore, are important for adhesion to the host cells, uptake of nutrients and removal of metabolic waste products. Recently published genome sequences of members of the environmental chlamydiae *Simkania negevensis*, *Waddlia chondrophila* and *Parachlamydia acanthamoebae* showed fundamental differences in the composition of the outer membrane (Collingro, Tischler *et al.* 2011). Although these organisms share several of the main components of the outer membrane of members of the *Chlamydiaceae*, e.g. the major outer membrane protein (MOMP), the polymorphic membrane proteins (Pmps) and the cysteine-rich proteins OmcA and OmcB, genes encoding some of these key components were also absent in certain members of the analyzed environmental chlamydiae.

The main objective of this research project was the investigation of the outer membrane proteins of these three environmental chlamydiae to complement and validate the *in silico* analysis using a proteomic approach. For this purpose, elementary bodies (EBs) of all three organisms were purified via density gradient centrifugation, followed by an extraction of the outer membrane proteins using three different methods and an analysis of the in-gel digested proteins via mass spectrometry. For *S. negevensis*, outer membrane proteins identified by mass spectrometry matched the *in silico* predictions. For example, 35 MOMP-like proteins were identified, while OmcA and OmcB were not. We also detected all copies of the autotransporter PmpD encoded in the genome. Additionally many uncharacterized proteins in the outer membrane fraction were found, which should be further analyzed, to figure out their possible function in infections or in the developmental cycle. The MOMP-like proteins were highly abundant and contained (like all other found proteins) a low content of cysteines, indicating a different mechanism for stabilizing the outer membrane in *S. negevensis*. This was further verified by a stability assay, where *S. negevensis* EBs did not show decreased infectivity rates after treatment with the disulfide-reducing agent dithiothreitol (DTT), in contrast to the influence of DTT on *Chlamydiaceae* (Hackstadt, Todd *et al.* 1985). In addition specific antibodies against purified EBs of *S. negevensis* and *P. acanthamoebae* were produced, which will help to find immunodominant proteins.

## Summary

This work provides a first insight in the composition of expressed proteins in the outer membrane of *S. negevensis* EBs and is therefore useful as a basis for further analysis of the function and structure of these proteins.

## 7 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Phylogenetischer Stammbaum basierend auf 16S rRNS von bekannten Chlamydien .....	1
Abb. 2: Der zweistufige Entwicklungszyklus von Chlamydien in Amöben .....	2
Abb. 3: Fluoreszenz <i>in situ</i> -Hybridisierung von <i>Acanthamoeba</i> sp. UWC1 infiziert mit <i>Simkania negevensis</i> .....	3
Abb. 4: Fluoreszenz <i>in situ</i> -Hybridisierung von <i>Acanthamoeba</i> sp. UWC1 infiziert mit <i>Parachlamydia acanthamoebae</i> .....	4
Abb. 5: Fluoreszenz <i>in situ</i> -Hybridisierung von <i>Acanthamoeba</i> sp. UWC1 infiziert mit <i>Waddlia chondrophila</i> .....	5
Abb. 6: Modell der inneren und äußeren Membran von <i>Chlamydiaceae</i> .....	6
Abb. 7: Epifluoreszenzmikroskopieaufnahmen der mit unterschiedlichen Dichtegradienten hochaufgereinigten <i>Simkania negevensis</i> EBs .....	46
Abb. 8: Elektronenmikroskopische Aufnahme der hochaufgereinigten Elementarkörperchen von <i>Parachlamydia acanthamoebae</i> UV7, <i>Waddlia chondrophila</i> und <i>Simkania negevensis</i> .....	48
Abb. 9: Detektion von <i>S. negevensis</i> -, <i>P. acanthamoebae</i> - und <i>W. chondrophila</i> in infizierten <i>Acanthamoeba</i> sp. UWC1-Zellen.....	51
Abb. 10: Vergrößerung der Immunfluoreszenzmikroskopieaufnahme einer mit <i>P. acanthamoebae</i> infizierten <i>Acanthamoeba</i> sp. UWC1-Zelle.....	52
Abb. 11: Immunfluoreszenzmikroskopieaufnahmen mit anti-Wc-Antikörpern, die an Zellbestandteile der Amöben, aber nicht an <i>W. chondrophila</i> - oder <i>S. negevensis</i> -Zellen binden .....	53
Abb. 12: SDS-PAGE der Außenmembranproteinfraktionen der drei untersuchten Umweltchlamydien nach Extraktion mit Sarkosyl .....	54
Abb. 13: SDS-PAGE der Außenmembranproteine von <i>S. negevensis</i> und <i>P. acanthamoebae</i> nach Extraktion mit Sarkosyl, <i>n</i> -octyl POE und Triton X-114 .....	55
Abb. 14: Westernblot und SDS-PAGE mit Außenmembranproteinfraktionen von <i>S. negevensis</i> nach Extraktion mit Sarkosyl.....	57
Abb. 15: SDS-PAGE der Außenmembranproteine von <i>S. negevensis</i> EBs nach Extraktion mit Sarkosyl, <i>n</i> -octyl POE und Triton X-114 .....	58
Abb. 16: Immunfluoreszenzmikroskopieaufnahmen des Ein-Stunden-Zeitpunkts aus dem Stabilitätsexperiments mit <i>Simkania negevensis</i> EBs.....	69

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 17: Stabilitätsexperiment mit <i>Simkania negevensis</i> .....	69
Abb. 18: Modell der inneren und äußeren Membran von <i>Simkania negevensis</i> . ....	73
Abb. 19: Vergleich von <i>Chlamydiales</i> hinsichtlich cysteinreicher Proteine und Cysteinanteilen im Protein.....	79

## 8 Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Vergleich von <i>in silico</i> ermittelten „Außenmembran“-Genen in den Genomen von <i>Simkania negevensis</i> , <i>Waddlia chondrophila</i> , <i>Parachlamydia acanthamoebae</i> UV7, <i>Protochlamydia amoebophila</i> UWE25 und <i>Chlamydiaceae</i> .....	9
Tab. 2: Verwendete Software .....	11
Tab. 3: Verwendete technische Geräte .....	11
Tab. 4: Verwendetes Verbrauchsmaterial .....	12
Tab. 5: Verwendete Kits .....	13
Tab. 6: Verwendete Chemikalien .....	13
Tab. 7: Verwendete Enzyme und Enzympuffer .....	15
Tab. 8: Verwendete Organismen .....	15
Tab. 9: Verwendete Primer .....	15
Tab. 10: Verwendete Sonden .....	15
Tab. 11: Verwendete primäre Antikörper .....	16
Tab. 12: Verwendete sekundäre Antikörper .....	16
Tab. 13: Programmierung des Cyclers für die PCR .....	28
Tab. 14: Verwendete bioinformatische Software zur Vorhersage von Außenmembranproteinen .....	42
Tab. 15: Antikörpertest nach der finalen Blutentnahme durch Immunfluoreszenzanalyse .....	50
Tab. 16: Kreuzreaktionstest der produzierten Antikörper aus der finalen Blutentnahme mittels Immunfluoreszenzanalyse .....	52
Tab. 17: Gesamtübersicht der durch MS identifizierten Proteine aus dem 1. und 2. Lauf .....	59
Tab. 18: Gesamtübersicht der durch die bioinformatische Software vorhergesagten Außenmembran-proteine von <i>S. negevensis</i> aus dem 1. und 2. Lauf .....	60
Tab. 19: Auszug aus den massenspektrometrischen Ergebnissen des 2. Laufs .....	61
Tab. 20: Auszug aus den massenspektrometrischen Ergebnissen des 1. Laufs .....	63

## Tabellenverzeichnis

Tab. 21: Vergleich zweier hypothetischer Proteine und eines MOMP-ähnlichen Protein aus Bahn 3 des 2. Laufs mittels der angewendeten bioinformatischen Software .....	65
Tab. 22: Vergleich von <i>in silico</i> -vorhergesagten mit massenspektrometrisch-nachgewiesenen Außenmembranproteinen von <i>Simkania negevensis</i> des 1. und 2. Laufs .....	66
Tab. 23: Drei häufige cysteinreiche Proteine aus den mit Sarkosyl B, n-octyl POE und Triton X extrahierten Proteine des 2. Laufs, charakterisiert durch den Cysteingehalt, das Molekulargewicht, das Vorhandensein eines Signalpeptids, einer $\alpha$ -Helix, eines $\beta$ -Barrels und der Lokalisation durch PSORTdb .....	66

## 9 Liste der verwendeten Abkürzungen

16S rRNS	kleine ribosomale Ribonukleinsäure (Untereinheit bei Prokaryoten)
A	Adenin, Österreich
<i>A.</i>	<i>Acanthamoeba</i>
Abb.	Abbildung
ABC	Ammoniumbicarbonat
ACN	Acetonitril
ATP	Adenosintriphosphat
B	Belgien
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin, Kohlenstoff
<i>C.</i>	<i>Chlamydia</i>
CH	Schweiz
CLSM	konfokales Laser Scanning Mikroskop
D	Deutschland
Da	Dalton
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DK	Dänemark
ddH <sub>2</sub> O	doppelt destiliertes Wasser
dest.	destilliert
DIC	Differentialinterferenzkontrast
DIOC <sub>6</sub>	3,3'-Dihexyloxacarbocyaniniodid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynucleotidtriphosphat
EB(s)	Elementarkörperchen
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
<i>en.</i>	Englisch
<i>et al.</i>	<i>Et alteri</i>
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
FA	Formamid
FISH	Fluoreszierende <i>in situ</i> -Hybridisierung

## Liste der verwendeten Abkürzungen

FLUOS	5,(6)-Carboxyfluorescein-N-hydroxysuccimidester
g	Gramm, Gravitation
G	Guanin
HCl	Salzsäure
HRP	Meerrettichperoxidase (en. <i>horseradish-Peroxidase</i> )
Hsp	Hitzeschockprotein
J	Japan
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
l	Liter
μ	Mikro
m	Milli, Meter
M	Molar, Mol pro Liter
mg	Milligramm
Min.	Minute(n)
ml	Milliliter
mM	Millimol pro Liter
MOI	Multiplizität der Infektion (en. <i>Multiplicity of infection</i> )
MOMP	Major outer membrane protein
MS	Massenspektrometrie
mRNS	Boten-Ribonukleinsäure (en. <i>messenger-Ribonukleinsäure</i> )
N	Normal
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natronlauge
NaAc	Natriumacetat
nm	Nanometer
OmcA und B	“Outer membrane complex” A und B
<i>P.</i>	<i>Parachlamydia</i> , <i>Protochlamydia</i>
p.a.	pro analysi
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PCR	Polymerase Kettenreaktion (en. <i>Polymerase chain reaction</i> )
PFA	Para-Formaldehyd
Pmps	polymorphe Membranproteine
RNS	Ribonukleinsäure



## Liste der verwendeten Abkürzungen

rDNS	ribosomale Desoxyribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
S	Schweden
<i>S.</i>	<i>Simkania</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
Sek.	Sekunde(n)
sp.	Spezies
Std.	Stunde(n)
T	Thymin
Tab.	Tabelle
<i>Taq</i>	DNS-abhängige DNS Polymerase aus <i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris/Borsäure/EDTA
TEM	Transelektronenmikroskopie
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethane-1,2-diamine
Template	Vorlage, Matrize
Tris	Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan
TSY	Trypticase Soy Broth with Yeast Extract
U	units, Uracil
UK	United Kingdom
ÜN	über Nacht
USA	United States of America
V	Volt
vgl.	Vergleich
UV	Ultraviolett
Vol	Volumenanteile
<i>W.</i>	<i>Waddlia</i>
w/v	Masse pro Volumen
w/w	Masse pro Masse

## 10 Referenzen

- Abdelrahman, Y. M. and R. J. Belland (2005). "The chlamydial developmental cycle." FEMS Microbiol Rev **29**(5): 949-59.
- Amann, R., N. Springer, et al. (1997). "Obligate intracellular bacterial parasites of acanthamoebae related to *Chlamydia* spp." Appl Environ Microbiol **63**(1): 115-21.
- Arnold, T. and D. Linke (2008). The Use of Detergents to Purify Membrane Proteins. Current Protocols in Protein Science, John Wiley & Sons, Inc.
- Baud, D., L. Regan, et al. (2008). "Emerging role of *Chlamydia* and *Chlamydia*-like organisms in adverse pregnancy outcomes." Curr Opin Infect Dis **21**(1): 70-6.
- Bavoil, P., A. Ohlin, et al. (1984). "Role of disulfide bonding in outer membrane structure and permeability in *Chlamydia trachomatis*." Infect Immun **44**(2): 479-85.
- Bébéar, C. and B. de Barbeyrac (2009). "Genital *Chlamydia trachomatis* infections." Clin Microbiol Infect.
- Belland, R., D. M. Ojcius, et al. (2004). "Focus: Chlamydia." Nat Rev Micro **2**(7): 530-531.
- Bendtsen, J., H. Nielsen, et al. (2004). "Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0." J. Mol. Biol.
- Bertelli, C., F. Collyn, et al. (2010). "The *Waddlia* Genome: A Window into Chlamydial Biology." PLoS ONE **5**(5): e10890.
- Berven, F., K. Flikka, et al. (2004). "BOMP: a program to predict integral beta-barrel outer membrane proteins encoded within genomes of Gram-negative bacteria." Nucl. Acids Res.
- Birkelund, S., M. Morgan-Fisher, et al. (2009). "Analysis of proteins in *Chlamydia trachomatis* L2 outer membrane complex, COMC." FEMS Immunol Med Microbiol.
- Blasi, F., P. Tarsia, et al. (2009). "*Chlamydophila pneumoniae*." Clin Microbiol Infect.
- Brahma, A., C. Mandal, et al. (2005). "Characterization of a dimeric unfolding intermediate of bovine serum albumin under mildly acidic condition." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins & Proteomics **1751**(2): 159-169.
- Brito, W. d. A., T. C. V. Rezende, et al. (2011). "Identification, characterization and regulation studies of the aconitase of *Paracoccidioides brasiliensis*." Fungal Biology **115**(8): 697-707.
- Burton, M. J. and D. C. W. Mabey (2009). "The Global Burden of Trachoma: A Review." PLoS Negl Trop Dis **3**(10): e460.

## Referenzen

- Caldwell, H. D., J. Kromhout, et al. (1981). "Purification and partial characterization of the major outer membrane protein of *Chlamydia trachomatis*." Infect Immun **31**(3): 1161-76.
- Caldwell, H. D., J. Kromhout, et al. (1981). "Purification and partial characterization of the major outer membrane protein of *Chlamydia trachomatis*." Infect. Immun. **31**(3): 1161-1176.
- CDC (2011) "Chlamydia - CDC Fact Sheet.  
<http://www.cdc.gov/std/chlamydia/STDFact-Chlamydia.htm>."
- Cleland, W. W. (1964). "Dithiothreitol, a New Protective Reagent for SH Groups\*." Biochemistry **3**(4): 480-482.
- Collingro, A., S. Poppert, et al. (2005). "Recovery of an environmental chlamydia strain from activated sludge by co-cultivation with *Acanthamoeba* sp." Microbiology **151**(Pt 1): 301-9.
- Collingro, A., P. Tischler, et al. (2011). "Unity in variety--the pan-genome of the Chlamydiae." Mol Biol Evol.
- Corsaro, D., D. Venditti, et al. (2002). "New parachlamydial 16S rDNA phylotypes detected in human clinical samples." Res Microbiol **153**(9): 563-7.
- Cowan, S., T. Schirmer, et al. (1992). "Crystal structures explain functional properties of two *E. coli* porins." Nature.
- Dilbeck, P. M., J. F. Evermann, et al. (1990). "Isolation of a previously undescribed rickettsia from an aborted bovine fetus." J Clin Microbiol **28**(4): 814-6.
- Draghi, A., 2nd, V. L. Popov, et al. (2004). "Characterization of "*Candidatus* piscichlamydia salmonis" (order *Chlamydiales*), a chlamydia-like bacterium associated with epitheliocystis in farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*)."  
J Clin Microbiol **42**(11): 5286-97.
- Emanuelsson, O., S. Brunak, et al. (2007). "Locating proteins in the cell using TargetP, SignalP and related tools." Nat. Protocols **2**(4): 953-971.
- Everett, K., D. Desiderio, et al. (1994). "Characterization of lipoprotein EnvA in *Chlamydia psittaci* 6BC." J Bacteriol.
- Everett, K. D., R. M. Bush, et al. (1999). "Emended description of the order *Chlamydiales*, proposal of *Parachlamydiaceae* fam. nov. and *Simkaniaceae* fam. nov., each containing one monotypic genus, revised taxonomy of the family *Chlamydiaceae*, including a new genus and five new species, and standards for the identification of organisms." Int J Syst Bacteriol **49**: 415-40.
- Everett, K. D. and T. P. Hatch (1995). "Architecture of the cell envelope of *Chlamydia psittaci* 6BC." J. Bacteriol. **177**(4): 877-882.

- Fox, A., J. C. Rogers, et al. (1990). "Muramic acid is not detectable in *Chlamydia psittaci* or *Chlamydia trachomatis* by gas chromatography-mass spectrometry." Infect Immun **58**(3): 835-7.
- Friedman, M. G., B. Dvoskin, et al. (2003). "Infections with the chlamydia-like microorganism *Simkania negevensis*, a possible emerging pathogen." Microbes Infect **5**(11): 1013-21.
- Friedman, M. G., S. Kahane, et al. (2006). "Detection of *Simkania negevensis* by culture, PCR, and serology in respiratory tract infection in Cornwall, UK." J Clin Pathol **59**(3): 331-3.
- Fritsche, T. R., R. K. Gautom, et al. (1993). "Occurrence of bacteria endosymbionts in *Acanthamoeba* spp. isolated from corneal and environmental specimens and contact lenses." J. Clin. Microbiol. **31**: 1122-1126.
- Fritsche, T. R., M. Horn, et al. (2000). "Phylogenetic diversity among geographically dispersed *Chlamydiales* endosymbionts recovered from clinical and environmental isolates of *Acanthamoeba* spp." Appl Environ Microbiol **66**(6): 2613-9.
- Fritsche, T. R., D. Sobek, et al. (1998). "Enhancement of in vitro cytopathogenicity by *Acanthamoeba* spp. following acquisition of bacterial endosymbionts." FEMS Microbiol Letters **166**: 231-236.
- Gomes, J. P., A. Nunes, et al. (2006). "Polymorphisms in the nine polymorphic membrane proteins of *Chlamydia trachomatis* across all serovars: evidence for serovar Da recombination and correlation with tissue tropism." J Bacteriol **188**(1): 275-86.
- Gore, J., Z. Bryant, et al. (2006). "Mechanochemical analysis of DNA gyrase using rotor bead tracking." Nature **439**(7072): 100-104.
- Greub, G., I. Boyadjiev, et al. (2003). "Serological hint suggesting that *Parachlamydiaceae* are agents of pneumonia in polytraumatized intensive care patients." Ann N Y Acad Sci **990**: 311-9.
- Greub, G., J.-L. Mege, et al. (2003). "*Parachlamydia acanthamoebae* enters and multiplies within human macrophages and induces their apoptosis." Infect. Immun. **71**(10): 5979-5985.
- Greub, G. and D. Raoult (2002). "Crescent bodies of *Parachlamydia acanthamoebae* and its life cycle within *Acanthamoeba polyphaga*: an electron micrograph study." Appl Environ Microbiol **68**(6): 3076-84.
- Grimwood, J. and R. S. Stephens (1999). "Computational analysis of the polymorphic membrane protein superfamily of *Chlamydia trachomatis* and *Chlamydia pneumoniae*." Microb Comp Genomics **4**(3): 187-201.

## Referenzen

- Hackstadt, Todd , et al. (1985). "Disulfide-mediated interactions of the chlamydial major outer membrane protein: role in the differentiation of chlamydiae." J Bacteriol.
- Haider, S., M. Wagner, et al. (2010). "Raman microspectroscopy reveals long-term extracellular activity of Chlamydiae." Mol Microbiol.
- Hatch, T. (1996). "Disulfide cross-linked envelope proteins: the functional equivalent of peptidoglycan in chlamydiae?" J. Bacteriol. **178**(1): 1-5.
- Hatch, T. P., I. Allan, et al. (1984). "Structural and polypeptide differences between envelopes of infective and reproductive life cycle forms of *Chlamydia* spp." J. Bacteriol. **157**(1): 13-20.
- Hatch, T. P., D. W. Vance, Jr., et al. (1981). "Identification of a major envelope protein in *Chlamydia* spp." J. Bacteriol. **146**(1): 426-429.
- Heinz, E., G. Myers, et al. (2008). "Outer membrane proteins in *Parachlamydiaceae*, *Simkaniaceae* and *Waddliaceae*." Department of Microbial Ecology, Vienna, University of Vienna.
- Heinz, E., P. Pichler, et al. (2010). "Proteomic analysis of the outer membrane of *Protochlamydia amoebophila* elementary bodies." PROTEOMICS
- Heinz, E., P. Pichler, et al. (2008). "Deciphering the Chlamydial Cell Envelope – a Genome and Proteome Based Analysis of Outer Membrane Proteins." Department of Microbial Ecology, Faculty of Life Sciences, University of Vienna, Austria.
- Heinz, E., P. Tischler, et al. (2009). "Comprehensive in silico prediction and analysis of chlamydial outer membrane proteins reflects evolution and life style of the *Chlamydiae*." BMC Genomics **10**(1): 634.
- Henderson, I. R. and A. C. Lam (2001). "Polymorphic proteins of *Chlamydia* spp. - autotransporters beyond the Proteobacteria." Trends in Microbiology **9**(12): 573-578.
- Henderson, I. R., F. Navarro-Garcia, et al. (2004). "Type V protein secretion pathway: the autotransporter story." Microbiol Mol Biol Rev **68**(4): 692-744.
- Henning, K., G. Schares, et al. (2002). "*Neospora caninum* and *Waddlia chondrophila* strain 2032/99 in a septic stillborn calf." Veterinary Microbiology **85**(3): 285-292.
- Hörmann, A. (2010). Characterization of novel porins from *Protochlamydia amoebophila* UWE25. Department of microbial Ecology, Wien, Universität Wien.
- Horn, M. (2008). *Chlamydiae* as Symbionts in Eukaryotes. Annual Review of Microbiology. Palo Alto, Annual Reviews. **62**: 113-131.
- Horn, M., A. Collingro, et al. (2004). "Illuminating the evolutionary history of chlamydiae." Science **304**(5671): 728-30.

## Referenzen

- Howard, L., N. Orenstein, et al. (1974). "Purification on renografin density gradients of *Chlamydia trachomatis* grown in the yolk sac of eggs." Appl Microbiol.
- Hurbain, I. and M. Sachse (2011). "The future is cold: cryo-preparation methods for transmission electron microscopy of cells." Biology of the Cell **103**(9): 405-420.
- Hybiske, K. and R. S. Stephens (2007). "Mechanisms of host cell exit by the intracellular bacterium *Chlamydia*." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(27): 11430-5.
- Juncker, A., H. Willenbrock, et al. (2003). "Prediction of lipoprotein signal peptides in Gram-negative bacteria." Protein Sci.
- Kahane, S., D. Fruchter, et al. (2007). "Versatility of *Simkania negevensis* infection in vitro and induction of host cell inflammatory cytokine response." Journal of Infection **55**(2): e13-e21.
- Kahane, S., R. Gonen, et al. (1993). "Description and partial characterization of a new chlamydia-like microorganism." FEMS Microbiol Letters **109**: 329-334.
- Kahane, S., N. Kimmel, et al. (2002). "The growth cycle of *Simkania negevensis*." Microbiology **148**(Pt 3): 735-42.
- Kahane, S., N. Platzner, et al. (2004). "Evidence for the presence of *Simkania negevensis* in drinking water and in reclaimed wastewater in Israel." Appl Environ Microbiol **70**(6): 3346-51.
- Koning, A., P. Lum, et al. (1993). "DiOC6 staining reveals organelle structure and dynamics in living yeast cells."
- Kostanjsek, R., J. Strus, et al. (2004). "'*Candidatus* Rhabdochlamydia porcellionis', an intracellular bacterium from the hepatopancreas of the terrestrial isopod *Porcellio scaber* (Crustacea: Isopoda)." Int J Syst Evol Microbiol **54**(Pt 2): 543-9.
- Krogh, A., B. r. Larsson, et al. (2001). "Predicting transmembrane protein topology with a hidden markov model: application to complete genomes." Journal of Molecular Biology **305**(3): 567-580.
- Kubo, A. and R. S. Stephens (2000). "Characterization and functional analysis of PorB, a *Chlamydia* porin and neutralizing target." Mol Microbiol **38**(4): 772-80.
- Kumar, S., S. A. Kohlhoff, et al. (2005). "Infection with *Simkania negevensis* in Brooklyn, New York." Pediatr Infect Dis J **24**(11): 989-92.
- Li, D., A. Vaglenov, et al. (2005). "High-yield culture and purification of *Chlamydiaceae* bacteria." Journal of Microbiological Methods **61**(1): 17-24.
- Liu, H., R. G. Sadygov, et al. (2004). "A Model for Random Sampling and Estimation of Relative Protein Abundance in Shotgun Proteomics." Analytical Chemistry **76**(14): 4193-4201.

## Referenzen

- Liu, X., M. Afrane, et al. (2010). "Identification of *Chlamydia trachomatis* Outer Membrane Complex Proteins by Differential Proteomics." J Bacteriol.
- Mahasreshti, P., G. Murphy, et al. (1997). "Purification and partial characterization of the OmpA family of proteins of *Pasteurella haemolytica*." Infect Immun.
- Martin, S. and J. Pavelka (2007). "Another brick in the wall." Trends in Microbiology **15**(4): 147-149.
- McCoy, A. J. and A. T. Maurelli (2005). "Characterization of *Chlamydia* MurC-Ddl, a fusion protein exhibiting D-alanyl-D-alanine ligase activity involved in peptidoglycan synthesis and D-cycloserine sensitivity." Mol Microbiol **57**(1): 41-52.
- McCoy, A. J. and A. T. Maurelli (2006). "Building the invisible wall: updating the chlamydial peptidoglycan anomaly." Trends in Microbiology **14**(2): 70-77.
- McCoy, A. J., R. C. Sandlin, et al. (2003). "In vitro and in vivo functional activity of *Chlamydia* MurA, a UDP-N-acetylglucosamine enolpyruvyl transferase involved in peptidoglycan synthesis and fosfomycin resistance." J Bacteriol **185**(4): 1218-28.
- Miseta, A. and P. Csutora (2000). "Relationship Between the Occurrence of Cysteine in Proteins and the Complexity of Organisms." Molecular Biology and Evolution **17**(8): 1232-1239.
- Miyashita, N., Y. Kanamoto, et al. (1993). "The morphology of *Chlamydia pneumoniae*." J Med Microbiol.
- Moelleken, K. and J. H. Hegemann (2008). "The *Chlamydia* outer membrane protein OmcB is required for adhesion and exhibits biovar-specific differences in glycosaminoglycan binding." Mol Microbiol **67**(2): 403-19.
- Mölleken, K., E. Schmidt, et al. (2011). "Members of the Pmp protein family of *Chlamydia pneumoniae* mediate adhesion to human cells via short repetitive peptide motifs." Molecular Microbiology **78**(4): 1004-1017.
- Newhall, V., J. Wilbert, et al. (1983). "Disulfide-Linked Oligomers of the Major Outer Membrane Protein of *Chlamydiae*." J. Bacteriol. **154**(2): 998-1001.
- Nieves, W., J. Heang, et al. (2010). "Immunospecific responses to bacterial elongation factor Tu during *Burkholderia* infection and immunization." PLoS ONE.
- Nikaido, H. (2003). "Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited." Microbiol Mol Biol Rev **67**(4): 593-656.
- Olsen, J., J. Schwartz, et al. (2009). "A dual pressure linear ion trap Orbitrap instrument with very high sequencing speed." Mol Cell Proteomics.

## Referenzen

- Patin, D., J. Bostock, et al. (2012). "Biochemical characterisation of the chlamydial MurF ligase, and possible sequence of the chlamydial peptidoglycan pentapeptide stem." Archives of Microbiology: 1-8.
- Petersen, T., S. Brunak, et al. (2011). "SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions." Nature Methods.
- Pilhofer, M., M. S. Ladinsky, et al. Chapter 2 - Bacterial TEM: New Insights from Cryo-Microscopy. Methods in Cell Biology, Academic Press. **Volume 96**: 21-45.
- Rake, G. W. (1957). "Family *Chlamydiaceae* fam. nov." In Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, pp. 957-968. Edited by R. S. Breed, E. G. D. Murray & N. R. Smith. Baltimore: Williams & Wilkins.
- Rey, S., M. Acab, et al. (2005). "PSORTdb: a protein subcellular localization database for bacteria." Nucl. Acids Res.
- Rodriguez-Zaragoza, S. (1994). "Ecology of free living amoebae." Crit Rev Microbiol **20**(3): 225-241.
- Rüegg, U. T., J. Rudinger, et al. (1977). [10] Reductive cleavage of cystine disulfides with tributylphosphine. Methods in Enzymology, Academic Press. **Volume 47**: 111-116.
- Rurangirwa, F. R., P. M. Dilbeck, et al. (1999). "Analysis of the 16S rRNA gene of microorganism WSU 86-1044 from an aborted bovine foetus reveals that it is a member of the order *Chlamydiales*: proposal of *Waddliaceae* fam. nov., *Waddlia chondrophila* gen. nov., sp. nov." Int J Syst. Bacteriol **49**: 577-581.
- Salinovich, O. and R. Montelaro (1986). "Reversible staining and peptide mapping of proteins transferred to nitrocellulose after separation by sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis." Anal Biochem.
- Schmitz-Esser, S., E. R. Toenshoff, et al. (2008). "Diversity of Bacterial Endosymbionts of Environmental Acanthamoeba Isolates." Applied and Environmental Microbiology **74**(18): 5822-5831.
- Siegl, A. and M. Horn (2011). Chapter 3: Lessons from environmental chlamydiae. Intaracellular Pathogens I: Chlamydia. Department of Microbial Ecology, University of Vienna.
- Sixt, B. S., C. Heinz, et al. (2011). "Proteomic analysis reveals a virtually complete set of proteins for translation and energy generation in elementary bodies of the amoeba symbiont *Protochlamydia amoebophila*." PROTEOMICS **11**(10): 1868-1892.
- Sixt, B. S., B. Hiess, et al. (2012). "Lack of Effective Anti-Apoptotic Activities Restricts Growth of *Parachlamydiaceae* in Insect Cells." PLoS ONE **7**(1): e29565.
- Stephens, R., S. Kalman, et al. (1998). "Genome Sequence of an Obligate Intracellular Pathogen of Humans: *Chlamydia trachomatis*." Science.



## Referenzen

- Stephens, R. S. and C. J. Lammel (2001). "Chlamydia outer membrane protein discovery using genomics." Current Opinion in Microbiology **4**(1 SU -): 16-20.
- Stothard, D. R., G. A. Toth, et al. (2003). "Polymorphic membrane protein H has evolved in parallel with the three disease-causing groups of *Chlamydia trachomatis*." Infect Immun **71**(3): 1200-8.
- Su, H., N. G. Watkins, et al. (1990). "*Chlamydia trachomatis*-host cell interactions: role of the chlamydial major outer membrane protein as an adhesin." Infect Immun.
- Su, H., Y.-X. Zhang, et al. (1985). "Presence of muramic acid in *Chlamydia trachomatis* proved by liquid chromatography-mass spectrometry." Kexue Tongbao **30**: 695.
- Thao, M. L., L. Baumann, et al. (2003). "Phylogenetic evidence for two new insect-associated *Chlamydia* of the family *Simkaniaceae*." Curr Microbiol **47**(1): 46-50.
- Wang, Y., S. Kahane, et al. (2011). "Development of a Transformation System for *Chlamydia trachomatis*: Restoration of Glycogen Biosynthesis by Acquisition of a Plasmid Shuttle Vector." PLoS Pathog **7**(9): e1002258.
- Watson, M. W., I. N. Clarke, et al. (1995). "The CrP operon of *Chlamydia psittaci* and *Chlamydia pneumoniae*." Microbiology **141**(10): 2489-2497.
- Webb-Robertson, B.-J. M. and W. R. Cannon (2007). "Current trends in computational inference from mass spectrometry-based proteomics." Briefings in Bioinformatics **8**(5): 304-317.
- Wehrl, W., V. Brinkmann, et al. (2004). "From the inside out--processing of the Chlamydial autotransporter PmpD and its role in bacterial adhesion and activation of human host cells." Mol Microbiol **51**(2): 319-34.
- Wolf, K., E. Fischer, et al. (2000). "Ultrastructural Analysis of Developmental Events in *Chlamydia pneumoniae*-Infected Cells." Infect. Immun. **68**(4): 2379-2385.
- Wyllie, S., R. H. Ashley, et al. (1998). "The major outer membrane protein of *Chlamydia psittaci* functions as a porin-like ion channel." Infect Immun **66**(11): 5202-7.
- Yu, N., M. Laird, et al. (2011). "PSORTdb--an expanded, auto-updated, user-friendly protein subcellular localization database for Bacteria and Archaea." Nucleic Acids Res.
- Zeth, K. and M. Thein (2010). "Porins in prokaryotes and eukaryotes: common themes and variations." Biochem J.
- Zhang, B., N. C. VerBerkmoes, et al. (2006). "Detecting Differential and Correlated Protein Expression in Label-Free Shotgun Proteomics." Journal of Proteome Research **5**(11): 2909-2918.

## 11 Danksagung

Mein herzlicher Dank geht an:

Univ.-Prof. Dr. Michael Wagner, dafür, dass ich in seinem Department meine Diplomarbeit durchführen durfte, für sein Feedback nach Präsentationen und seinem unermüdlichen Einsatz in der Leitung dieses Departments.

Univ.-Prof. Dr. Matthias Horn, für die Möglichkeit diese Diplomarbeit in seiner Gruppe zu erarbeiten und zu verfassen, für seine spannenden Vorlesungen und Kurse im Bereich der mikrobiellen Ökologie, die mein Interesse an dieser Gruppe geweckt haben und für seine Unterstützung während meiner Diplomarbeit.

Karin Aistleitner, für ihre kompetente Betreuung meiner Arbeit, die immer geduldig war und stets Fragen beantwortet hat. Für ihre lockere, aber auch konsequente Art, die mir gezeigt hat, wie man als Wissenschaftler/-in an Aufgaben herantritt.

Dr. Dorothea Anrather und Dr. Peter Pichler vom Department für Biochemie und Zellbiologie der Universität Wien, für die massenspektrometrischen Messungen.

Ass.-Prof. Dr. Rok Kostanjsek vom Department für Biologie der Universität Ljubljana und Mag.<sup>a</sup> Lena König, für die Transelektronenmikroskopie.

Martina Grill, für die vielen Bestellungen und das Sequenzieren meiner Proben und für die schmeichelhaften Komplimente, die mir meinen Tag versüßten.

Gabi Schwammel, für das Ernten und Pflegen einer meiner Kulturen am Ende meiner Diplomarbeit.

das gesamte DOME-Team, für die interessanten Vorträge und Diskussionen, die Hilfe im Labor und das lustige Beisammensein auch außerhalb der Arbeit, das stets zu einem entspannten Klima beigetragen hat.

## Danksagung

den 1. FFC Turbine Wien e.V., für den sportlichen Ausgleich und die lustigen Aktivitäten auch abseits des Fußballplatzes.

meine Freunde, allen voran meiner langjährigen Mitbewohnerin Thea, die mich immer unterstützt hat. Danke an meine Wiener Jungs - Luk, Mo, Nici, Phil, Sepp, für diverse Pokersessions, gemütliche Abenden, Partynächte und vielem mehr. Danke natürlich auch an die LA-West-Crew - Martl, Matti, Philli und die Hofberger Mädels - Lena und Toni.

meine Sonne - Naoko, für ihre Liebe und Unterstützung, die mir immer ein Lächeln auf meine Lippen gezaubert hat.

meine Omas und Opas, die sich immer um mich gesorgt haben, ob ich auch gut und genug esse und natürlich das Lernen nicht vergesse. Vielen Dank für das Taschengeld, mit dem ich mir meine Mittagessen finanziert habe.

Andi, dafür, dass er „nicht nur“ mein Bruder ist, sondern auch einer meiner besten Freunde.

meine Eltern Margarete und Helmut, für den Rückhalt und die Unterstützung, ohne die ich es nie soweit geschafft hätte. Danke, dass ihr immer an mich geglaubt habt!

## 12 Lebenslauf

### Thomas Schott

#### Persönliche Daten

Geburtsdatum:	07. Mai 1985
Geburtsort:	Landshut, Deutschland
Staatsbürgerschaft:	Deutschland

#### Ausbildung

Januar 2011	Beginn der Diplomarbeit am Department für mikrobielle Ökologie, Universität Wien
Oktober 2005	Studium der Biologie, Studiengang Mikrobiologie und Genetik, Universität Wien
Juni 2004	Abitur
1995 – 2004	Hans-Leinberger-Gymnasium, Landshut
1991 – 1995	Grundschule Carl Orff, Landshut